

Armierung von NK-Zellen mit den PSCA-spezifischen chimären Antigenrezeptoren NKp46- α PSCA und NKp46-KiBAP- α PSCA

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Biologin Susanne Michen
geboren am 25. Juli 1985
in Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Achim Temme, der es mir ermöglichte diese interessante Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und mich mit vielen hilfreichen Ideen und Diskussionen unterstützte.

Herrn Prof. Dr. Gerold Barth danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und der Erstellung des Gutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marc Schmitz für die Unterstützung bei den IFN- γ -Assays bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter und ehemaligen Mitarbeiter der AG Temme – Bianca, Isabell, Katja, Katrin, Krissi, Marina, Nadja, Sandy, Steffi R., Steffi T., Ralf und Frau Zachow – und des Hauses 31 – Alexa, Claudia, Elke, Helga, Luise, May-Linn, Sylvia, Tine und Trixi – für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Diskussionen. Besonderer Dank gilt dabei meinen beiden Mitstreiterinnen beim Thema „Chimäre Antigenrezeptoren“ Nadja und Katrin. Euer fachlicher und persönlicher Rat sowie eure Tipps und Tricks beim Experimentieren waren mir in jeder Phase der Arbeit sehr hilfreich. Großen Dank verdienen auch meine Blutabnehmer und Blutspender, die im Gegenzug für ein Knoppers und ein Teddypflaster meine Versuche mit primären NK-Zellen erst möglich gemacht haben. Weiterhin danke ich allen Mitgliedern des Büros 102, die mit mir die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit durchlebt haben und mit denen es viel Spaß gemacht hat zusammenzuarbeiten.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt haben, immer ein offenes Ohr für mich haben und für mich da sind.

Der größte Dank gilt meinem Mann Lutz. Ohne deine Unterstützung wäre dies alles nie möglich gewesen. Ich danke dir für deine Liebe, deine Aufmunterungen, deine Geduld und deinen Glauben an mich, alles schaffen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
1 Einleitung	1
1.1 Die humanen Natürlichen Killerzellen.....	2
1.1.1 Phänotyp	2
1.1.2 Funktionen.....	2
1.1.3 Aktivierende und inhibitorische NK-Zellrezeptoren	3
1.1.4 Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKp46 und sein Signaladaptermolekül CD3- ζ	5
1.1.5 Regulation der NK-Zellaktivität	7
1.2 NK-Zell-basierte Immuntherapie	8
1.3 Das Prostata-spezifische Stammzellantigen (PSCA) als tumorassoziiertes Antigen.....	11
1.4 Biotin-Avidin-Bindung.....	13
1.5 Die enzymatische Biotinylierung	15
1.5.1 Biotinproteinligase	15
1.5.2 Biotinakzeptorpeptide	16
1.5.3 Nutzungen der enzymatischen Biotinylierung	17
1.6 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Antibiotika	20
2.1.2 Antikörper	20
2.1.3 Bakterienstamm.....	22
2.1.4 Chemikalien	22
2.1.5 Enzyme.....	23

2.1.6	Größenstandards.....	24
2.1.7	Inhibitoren.....	24
2.1.8	Kommerzielle Kits.....	24
2.1.9	Lösungen und Puffer.....	25
2.1.10	Medien.....	27
2.1.11	Oligonukleotide.....	29
2.1.12	Plasmide.....	30
2.1.13	Software.....	31
2.1.14	Verbrauchsmittel.....	32
2.1.15	Zelllinien.....	32
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	34
2.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	34
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	34
2.2.3	Transformation von Bakterien.....	35
2.2.4	Blau-Weiß-Selektion.....	35
2.2.5	Plasmid-DNA-Präparation.....	36
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.3.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	38
2.3.3	Restriktionsendonukleasespaltung von DNA.....	38
2.3.4	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.3.5	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	39
2.3.6	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben.....	39
2.3.7	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten.....	40
2.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	40
2.3.9	DNA-Sequenzierung.....	40
2.3.10	RNA-Isolation.....	41
2.3.11	cDNA-Synthese.....	41

2.4	Proteinbiochemische Methoden	42
2.4.1	ELISA	42
2.4.2	Milde Lyse	42
2.4.3	Auftrennung von Membran- und zytoplasmatischen Proteinen	43
2.4.4	Proteinbestimmung	43
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	44
2.4.6	„Semidry“-Western Blot von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	45
2.4.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen ..	45
2.4.8	„Stripping“ von PVDF-Membranen.....	46
2.5	Zellbiologische Methoden.....	46
2.5.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	46
2.5.2	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin zur Generierung lentiviraler Partikel.....	49
2.5.3	Stabile Transduktion	50
2.5.4	Durchflusszytometrie	51
2.5.5	Überprüfung des zytotoxischen Potentials <i>in vitro</i>	52
2.5.6	Biotinylierung von eukaryontischen Zellen.....	54
3	Ergebnisse	58
3.1	Der chimäre Antigenrezeptor NKp46- α PSCA	58
3.1.1	Generierung des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA	58
3.1.2	Generierung der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46- α PSCA-k	59
3.1.3	Charakterisierung der CAR-armierten YTS NK-Zellen.....	63
3.1.4	Charakterisierung der CAR-armierten primären humanen NK-Zellen	65
3.1.5	Charakterisierung der humanen Tumorzelllinien	70
3.1.6	Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der CAR-armierten YTS und primären humanen NK-Zellen <i>in vitro</i>	73

3.2	Koexpression des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA und der CD3- ζ -Kette	79
3.2.1	Generierung eines Expressionsvektors für die CD3- ζ -Kette	79
3.2.2	Charakterisierung der CAR-armierten und CD3- ζ -Kette-exprimierenden YTS NK-Zellen.....	81
3.2.3	Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der CAR-armierten und CD3- ζ -Kette-exprimierenden YTS NK-Zellen <i>in vitro</i>	85
3.3	Der biotinylierbare Rezeptor NKp46-KiBAP	95
3.3.1	Generierung des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP	95
3.3.2	Charakterisierung der NKp46-KiBAP-exprimierenden Zelllinien.....	97
3.3.3	Exogene Biotinylierung	99
3.3.4	Endogene Biotinylierung	104
4	Diskussion.....	113
4.1	Der chimäre Antigenrezeptor NKp46- α PSCA.....	114
4.1.1	Gentechnisch modifizierte YTS und primäre NK-Zellen exprimieren den CAR NKp46- α PSCA.....	115
4.1.2	Die eingesetzten Zellen sind durch verschiedene Oberflächenmarker charakterisiert.....	117
4.1.3	CAR-exprimierende YTS und primäre NK-Zellen weisen eingeschränkte Effektorfunktionen auf	119
4.2	Koexpression des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA und der CD3- ζ -Kette	121
4.2.1	Gentechnisch modifizierte YTS NK-Zellen koexpressieren den CAR NKp46- α PSCA und die CD3- ζ -Kette	121
4.2.2	CAR- und CD3- ζ -koexpressierende YTS NK-Zellen sind reaktiv gegen PSCA-positive Tumorzellen	122
4.2.3	Weiterführende Arbeiten und mögliche Optimierungen	126
4.3	Der biotinylierbare Rezeptor NKp46-KiBAP	128
4.3.1	Gentechnisch modifizierte YTS NK-Zellen exprimieren den Rezeptor NKp46-KiBAP	128

4.3.2	NKp46-KiBAP-exprimierende YTS NK-Zellen sind exogen und endogen biotinylierbar	129
4.3.3	Der neuartige, modulare CAR wurde erfolgreich zusammengebaut	132
4.3.4	Mögliche Optimierungen und weiterführende Arbeiten	133
5	Zusammenfassung.....	134
	Literaturverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis.....	151
	Abbildungsverzeichnis.....	152
	Formelverzeichnis	155
	Abkürzungsverzeichnis	156
	Anhang.....	159
	A.1 Vektoren	159
	A.2 Sequenzen	163
	A.3 Selbstständigkeitserklärung.....	168

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2014) und stehen somit im Fokus der aktuellen Forschung. Generell entsteht Krebs durch die maligne Transformation einer einzelnen Körperzelle, in der sich genetische Defekte vor allem in den Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen angesammelt haben. Durch das gestörte Gleichgewicht zwischen diesen Genen sind die Tumorzellen resistent gegen wachstumsinhibitorische und apoptotische Signale. Daraus resultierend wachsen und teilen sich die Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Körperzellen unkontrolliert. Des Weiteren besitzen Tumorzellen das Potenzial das Wachstum von Blutgefäßen zu begünstigen, so dass sie zum einen eine verbesserte Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff erhalten und sich zum anderen über den Blutstrom im gesamten Körper verteilen und Metastasen ausbilden können (Hanahan & Weinberg, 2000 & 2011).

Die konventionelle Behandlung von Krebserkrankungen besteht aus der operativen Entfernung des Tumors mit einer sich anschließenden Radio- und/oder Chemotherapie. Allerdings verbleiben meist Tumorreste oder vereinzelt Tumorzellen (minimale Resterkrankung) und abgesiedelte Metastasen im Körper, was häufig eine Wiederkehr des Tumors (Rezidiv) zur Folge hat. Des Weiteren führen die konventionellen Behandlungsmethoden meist zu starken Nebenwirkungen, da sie angesichts ihrer fehlenden Selektivität neben Tumorzellen auch gesunde Körperzellen zerstören (Beer & Bubalo, 2001; Carlotto *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2009).

Vor diesem Hintergrund hat die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, die spezifisch Tumorzellen erkennen und eliminieren und zudem gesunde Körperzellen schonen, eine große Bedeutung in der heutigen Krebsforschung. Dabei ist die Aktivierung beziehungsweise Sensibilisierung von zytotoxischen Zellen, wie CD8⁺ T-Lymphozyten oder Natürliche Killerzellen, gegen tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene ein potenzieller Immuntherapieansatz (Ames & Murphy, 2014; Kalos & June, 2013; Park, Rosenberg & Morgan, 2011).

1.1 Die humanen Natürlichen Killerzellen

1.1.1 Phänotyp

Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurden 1975 erstmalig als große, granuläre Lymphozyten beschrieben (Herberman, Nunn & Lavrin, 1975; Kiessling, Klein & Wigzell, 1975). Sie umfassen etwa 5 % - 15 % der Zellen des peripheren Blutes, wobei ihr Anteil vom Tagesrhythmus sowie von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel Stress, körperliche Anstrengung, Infektions- oder Entzündungsreaktionen, beeinflusst wird (Born *et al.*, 1997; Bourin *et al.*, 1993). Die NK-Zellen sind durch die Expression von CD56 und CD16 (FcγRIII) bei gleichzeitiger Abwesenheit der T-Zellmarker CD3 oder TCR („T Cell Receptor“) gekennzeichnet (Griffin *et al.*, 1983; Perussia *et al.*, 1983). Anhand der Expressionsdichte von CD56 und CD16 werden zwei Subpopulationen von NK-Zellen unterschieden, zum einen NK^{CD56dim/CD16bright}-Zellen und zum anderen NK^{CD56bright/CD16dim}-Zellen, die sich auch funktionell unterscheiden (Cooper, Fehniger & Caligiuri, 2001). NK^{CD56dim/CD16bright}-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche eine geringe Dichte von CD56 (CD56^{dim}) und eine hohe Dichte von CD16 (CD16^{bright}). Sie entsprechen 90 % der Gesamtheit der NK-Zellen und weisen eine starke Zytotoxizität auf. Im Gegensatz dazu exprimieren die NK^{CD56bright/CD16dim}-Zellen viel CD56 (CD56^{bright}) und wenig CD16 (CD16^{dim}). Durch die Sekretion von großen Mengen an Zytokinen, wie Interferon (IFN)-γ, Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Interleukin (IL)-10 dienen sie vorrangig der Immunregulation (Young & Ortaldo, 2006).

1.1.2 Funktionen

NK-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie spielen aufgrund ihrer natürlichen Zytotoxizität eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen und der Erkennung und Eliminierung von malignen Zellen (Cerwenka & Lanier, 2001). Dazu binden die NK-Zellen dynamisch an die betreffenden Zielzellen, so dass es zur Ausbildung einer immunologischen Synapse kommt (Davis *et al.*, 1999). Aktivierte NK-Zellen entfalten dann über verschiedene Wege ihr zytotoxisches Potenzial. Zum einen exprimieren NK-Zellen die Todesrezeptorliganden FasL und TRAIL („Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand“) auf ihrer Oberfläche. Diese binden an die Todesrezeptoren FasR und TRAIL-R auf den Zielzellen, wodurch es in diesen zur Bildung des DISC („Death Inducing Signaling Complex“) kommt. Infolge dessen werden Caspasen aktiviert, die die Apoptose in den Zielzellen induzieren (Oshimi *et al.*, 1996; Zamai *et al.*, 1998). Zum anderen setzen die NK-Zellen aus ihren Granula Perforin und die Granzyme A und B in die immunologische Synapse frei. Dabei bildet Perforin durch Polymerisierung

Löcher in der Zielzellmembran, über die unter anderem die Granzyme in die Zielzelle gelangen. Die Serin-Proteasen Granzym A und B wiederum führen dann sowohl Caspase-unabhängig als auch -abhängig zur Apoptoseinduktion (Smyth *et al.*, 2005). Diese Degranulation der NK-Zellen kann durch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, „Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“) um das 10 bis 20fache gesteigert werden. Dazu müssen zunächst Antikörper an Antigenstrukturen auf der Zielzelloberfläche binden. Im Anschluss erfolgt die Bindung des NK-Zellrezeptors CD16 (FcR γ III) an die konstanten Regionen der IgG-Antikörper, was zu einer Kreuzvernetzung von CD16 und damit zur Aktivierung der Degranulation führt (Lanier, Ruitenberg & Phillips, 1988).

Neben der natürlichen Zytotoxizität in der frühen Phase der Immunantwort besitzen NK-Zellen eine immunregulatorische Funktion, wobei sie eine bedeutende Rolle bei der Vernetzung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem spielen (Trinchieri, 1989). Durch die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , sind sie imstande unter anderem die Reifung dendritischer Zellen zu beeinflussen (Gerosa *et al.*, 2002), die MHC-Klasse I-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen hoch zu regulieren (Wallach, Fellous & Revel, 1982), die T-Zellantwort in Richtung T-Helferzellen (Th1) zu lenken (Morandi *et al.*, 2006) und autoreaktive B-Zellen zu supprimieren (Takeda & Dennert, 1993).

Neueste *in vitro* und *in vivo* Studien deuten weiterhin an, dass sich aus den kurzlebigen NK-Zellen nach Virusinfektionen oder durch Zytokinstimulation langlebige, gedächtnisähnliche NK-Zellen entwickeln können (Cooper *et al.*, 2009; Leong *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2011a und b). Diese Fähigkeit war lange nur den T- und B-Lymphozyten zugeschrieben worden. Jedoch ist noch wenig über die Entstehungsprozesse und die Funktionsweise dieser gedächtnisähnlichen NK-Zellen bekannt.

1.1.3 Aktivierende und inhibitorische NK-Zellrezeptoren

NK-Zellen exprimieren gleichzeitig sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Dabei wird die NK-Zellaktivität durch ein Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert (Cerwenka & Lanier, 2001).

Die aktivierenden Rezeptoren besitzen kurze intrazelluläre Domänen ohne Aktivierungsmotiv. Sie sind mit Signaladaptermolekülen, wie DAP10, DAP12 und CD3- ζ , assoziiert, deren lange intrazelluläre Domänen Aktivierungsmotive tragen. DAP12 und CD3- ζ besitzen sogenannte ITAM („Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif“). Diese induzieren nach ihrer Phosphorylierung NK-Zell-aktivierende Signalkaskaden über die Protein-tyrosinkinasen ZAP-70 („Zeta-chain-Associated Protein kinase 70“) und Syk („Spleen tyrosine kinase“). DAP10 mit seinem aktivierenden YINM-Bindungsmotiv übermittelt hingegen über die Kinase PI3K („Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase“) aktivierende Signale an

die NK-Zelle. Im Gegensatz dazu zeichnen sich inhibitorische Rezeptoren durch lange intrazelluläre Domänen aus, die Inhibierungsmotive, sogenannte ITIM („Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif“) enthalten. Nach ihrer Phosphorylierung werden über die Tyrosinphosphatasen SHP-1 („Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase 1“) und SHP-2 inhibierende Signale in die NK-Zelle weitergegeben (Borrego *et al.*, 2002; Lanier, 2008).

Anhand ihrer Struktur werden die aktivierenden und inhibitorischen NK-Zellrezeptoren in drei große Gruppen unterteilt. Die wichtigsten Vertreter sind die KIR („Killer cell Immunoglobulin-like Receptor“), die aufgrund ihrer zwei oder drei extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Domänen zur Immunglobulinsuperfamilie gehören. Sie umfassen sowohl aktivierende als auch inhibitorische NK-Zellrezeptoren (Lanier, 1998). Jeder Rezeptor weist dabei eine Spezifität für eine Untergruppe von klassischen HLA („Human Leukocyte Antigen“) Klasse I-Molekülen (HLA-ABC) auf (Borrego *et al.*, 2002). Die Gruppe der NCR („Natural Cytotoxicity Receptors“) umfasst die drei aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46, die ebenfalls zur Immunglobulinsuperfamilie gehören (Pende *et al.*, 1999; Sivori *et al.*, 1997; Vitale *et al.*, 1998). Ihre zellulären Liganden sind noch weitestgehend unbekannt, jedoch erkennen sie Zielstrukturen auf malignen und virusinfizierten Zellen. Ein Ligand von NKp30 ist das auf humanen Tumorzellen exprimierte B7-H6 (Brandt *et al.*, 2009). NKp44 und NKp46 hingegen binden unter anderem virales Hämagglutinin (Arnon *et al.*, 2001; Mandelboim *et al.*, 2001). Die Gruppe der NKG2-Rezeptoren spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der NK-Zellaktivität. Sie gehören aufgrund ihrer extrazellulären Domäne, die Calcium-abhängig (C-Typ) verschiedene Zuckerstrukturen erkennt, zu den C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Houchins *et al.*, 1991). Mit Ausnahme von NKG2D bilden die NKG2-Rezeptoren Heterodimere mit dem Korezeptor CD94. Dabei handelt es sich bei NKG2A und -B um inhibitorische und bei NKG2C, -E und -H um aktivierende Rezeptoren. Sie binden an das nicht-klassische HLA-Klasse I-Molekül HLA-E, das Peptide von den Signalsequenzen der klassischen HLA-Klasse I-Moleküle und HLA-G präsentiert (López-Botet & Bellón, 1999). Im Gegensatz dazu bildet der aktivierende Rezeptor NKG2D Homodimere, die stressinduzierte Oberflächenmoleküle auf virusinfizierten und transformierten Zellen erkennen (Wu *et al.*, 1999). Dazu zählen zum einen MIC A/B („Major histocompatibility complex class I Chain-related“ A/B) und zum anderen ULBP1-4 („Unique Long 16-Binding Protein“ 1-4) (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001).

Neben diesen drei wichtigsten NK-Zellrezeptorgruppen existieren weitere NK-Zellrezeptoren, wie die aktivierenden Rezeptoren CD16 (FcγRIII) und DNAM-1, wobei ersterer die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) der NK-Zellen vermittelt und letzterer die tumorassoziierten Antigene Nektin-2 und PVR (Poliovirus-Rezeptor) erkennt (Bottino

et al., 2005; Lanier, 2008). Eine Übersicht der Rezeptoren und ihrer Liganden wird in Tabelle 1 anhand von Daten von Bottino *et al.* (2005) und Lanier (2008) gegeben.

Tabelle 1: Aktivierende und inhibitorische NK-Zellrezeptoren mit ihren Liganden. Bei den aktivierenden NK-Zellrezeptoren wurden die mit ihnen assoziierten Signaladaptermoleküle aufgeführt.

Name	CD-Nummer	Ligand	Funktion	Signaladaptermolekül
KIR	CD158	HLA-ABC	DL: inhibierend DS: aktivierend	- DAP12
NKp30	CD337	u.a. B7-H6	aktivierend	CD3- ζ -Homodimer
NKp44	CD336	u.a. virales Hämagglutinin	aktivierend	DAP12
NKp46	CD335	u.a. Heparin, virales Hämagglutinin	aktivierend	CD3- ζ -Homodimer, CD3- ζ -Fc ϵ R1 γ -Heterodimer
NKG2A	CD159a	HLA-E	inhibierend	-
NKG2C	CD159c	HLA-E	aktivierend	DAP12
NKG2D	CD314	MIC A/B, ULBP1-4	aktivierend	DAP10
Fc γ RIII	CD16	Fc-Anteil von IgG-Antikörpern	aktivierend	CD3- ζ - oder Fc ϵ R1 γ -Homodimer, CD3- ζ -Fc ϵ R1 γ -Heterodimer
DNAM-1	CD226	Nektin-2, PVR	aktivierend	LFA-1

1.1.4 Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKp46 und sein Signaladaptermolekül CD3- ζ

Im Jahr 1997 identifizierten Sivori *et al.* einen NK-Zellspezifischen Oberflächenrezeptor mit einem Molekulargewicht von 46 kDa, den sie darauf hin als NKp46 („Natural Killer cell p46-related protein“) bezeichneten. Er wird sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten NK-Zellen exprimiert (Sivori *et al.*, 1997). NKp46 ist Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und bildet zusammen mit NKp44 und NKp30 die Gruppe der NCR.

NKp46 spielt funktionell eine wichtige Rolle bei der NK-Zell-vermittelten Lyse sowohl von Tumorzellen als auch von Zellen, die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind. In einer Studie von Pessino *et al.* (1998) wurde nachgewiesen, dass NKp46 an der MHC-unabhängigen Lyse von verschiedenen humanen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel Melanomen, Lungen- und Leberkarzinomen sowie Epstein-Barr-Virus transformierten B-Zellen, beteiligt ist. Jedoch ist noch wenig über die zellulären Liganden von NKp46 bekannt. Studien zeigten, dass NKp46 an stark geladene, tumorassoziierte Heparansulfat-Proteoglykane sowie an die verwandten Heparine bindet (Hecht *et al.*, 2009). NKp46 dient weiterhin der NK-Zell-vermittelten Lyse von virusinfizierten Zellen. Zum einen erkennt NKp46 über seine *N*-Acetylneuraminsäurereste das Hämagglutinin des Influenza-Virus und zum anderen die Hämagglutinin-Neuraminidase des Parainfluenza-Virus sowie des Sendai-Virus (Mandelboim *et al.*, 2001). Ebenfalls erfolgt über NKp46 die NK-Zell-

vermittelte Lyse von Zellen, die mit Bakterien infiziert sind. So wurden in einer Studie von Vankayalapati *et al.* (2002) mit *Mycobacterium tuberculosis*-infizierte Monozyten durch NKp46 erkannt.

Strukturell besteht das 304 Aminosäuren umfassende NKp46 aus einer extrazellulären Domäne, die zwei C2-Typ Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält. Über eine Typ-I Transmembrandomäne ist diese mit einer kleinen intrazellulären Domäne aus 30 Aminosäuren verbunden, die keinerlei Aktivierungsmotive enthält (Pessino *et al.*, 1998). Des Weiteren besitzt NKp46 eine N- und zwei O-Glykosylierungsstellen (Pessino *et al.*, 1998). Die Signalweiterleitung in die NK-Zelle erfolgt über zwei verschiedene Adaptermoleküle, zum einen über das CD3- ζ -Homodimer und zum anderen über das CD3- ζ -Fc ϵ R1 γ -Heterodimer. Dabei wird in der Transmembrandomäne eine Bindung zwischen dem positiv geladenen Argininrest von NKp46 und dem negativ geladenen Asparaginsäurerest der Adaptermoleküle ausgebildet (Moretta *et al.*, 1999; Vitale *et al.*, 1998).

Die CD3- ζ -Kette (CD247) mit einem Molekulargewicht von 16 kDa besteht aus einer sehr kleinen extrazellulären Domäne, die nur neun Aminosäuren umfasst. Über eine Typ-I Transmembrandomäne ist diese mit einer 112 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne verbunden, die drei Aktivierungsmotive, sogenannte ITAM, enthält (Weissman *et al.*, 1988a). Die Phosphorylierung dieser ITAM induziert eine Signalkaskade, die aktivierende Signale über die Proteintyrosinkinase ZAP-70 in das Zellinnere weitergibt (Weissman *et al.*, 1988b). Über die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den extrazellulären Domänen entstehen CD3- ζ -Homodimere (Weissman *et al.*, 1988a). Diese sind auf der NK-Zelloberfläche neben NKp46 außerdem mit CD16 (Fc γ RIII) und NKp30 assoziiert (Lanier, Yu & Phillips, 1989; Pende *et al.*, 1999). Des Weiteren sind sie Bestandteil des T-Zellrezeptor-CD3-Komplexes (Clevers *et al.*, 1988). Jedoch bilden einige CD3- ζ -Ketten auch ein Heterodimer mit der γ -Untereinheit des Fc-Rezeptors Typ-I für IgE (Fc ϵ R1 γ), zu der sie in der extrazellulären Domäne und in der Transmembrandomäne starke Homologien aufweisen (Howard *et al.*, 1990). Allerdings besitzt Fc ϵ R1 γ mit einem Molekulargewicht von 9,7 kDa in der intrazellulären Domäne nur ein ITAM (Kinet, 1992), das nach seiner Phosphorylierung aktivierende Signale über die Proteintyrosinkinase Syk in das Zellinnere weiterleitet (Brumbaugh *et al.*, 1997). Das CD3- ζ -Fc ϵ R1 γ -Heterodimer ist neben NKp46 ebenfalls mit CD16 (Lanier, Yu & Phillips, 1989) assoziiert.

1.1.5 Regulation der NK-Zellaktivität

Die NK-Zellaktivität wird durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert (Cerwenka & Lanier, 2001). Dabei sind die NK-Zellen gegenüber gesunden, HLA-Klasse I-exprimierenden Körperzellen inaktiv, da die inhibierenden Signale, die über die inhibitorischen KIR sowie CD94/NKG2A und CD94/NKG2B in die NK-Zelle vermittelt werden, überwiegen („Self Tolerance“, Kärre *et al.*, 1986; Kärre, 1995). Im Gegensatz dazu werden von virusinfizierten oder transformierten Zellen oft die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle herunterreguliert oder gar nicht mehr exprimiert, um so einer T-Zellerkennung zu entgehen (Hicklin, Marincola & Ferrone, 1999; Ploegh, 1998). Durch die Reduktion der inhibierenden Signale, die über die autologen klassischen HLA-Klasse I-Moleküle und über HLA-E vermittelt werden, überwiegen allerdings die aktivierenden Signale und es erfolgt die Induktion der NK-Zelleffektorfunktionen („Missing Self“, Kärre *et al.*, 1986). Es werden jedoch ebenfalls virusinfizierte oder transformierte Zellen erkannt und eliminiert, die die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle weiterhin exprimieren. Dies erfolgt über die stressinduzierten Moleküle MIC A/B und ULBP1-4 auf der Oberfläche dieser Zellen, die durch den NK-Zellrezeptor NKG2D gebunden werden. Die so vermittelten aktivierenden Signale überwiegen die inhibitorischen Signale der HLA-Klasse I-Moleküle und führen so zur NK-Zellaktivierung („Induced Self“, Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001). Weiterhin präsentieren virusinfizierte und transformierte Zellen über HLA-E modifizierte Peptide auf ihrer Oberfläche. Diese „fremden“ Peptide stammen von den Viren selbst oder von Tumorstoffwechselprozessen. Dadurch kommt es zum Verlust von inhibierenden Signalen, da HLA-E nicht mehr von dem inhibitorischen NK-Zellrezeptor CD94/NKG2A sondern vom aktivierenden NK-Zellrezeptor CD94/NKG2C erkannt wird, so dass wiederum die aktivierenden Signale in der NK-Zelle überwiegen („Modified Self“, Malmberg, Beziat & Ljunggren, 2012; Michaëlsson *et al.*, 2002). Eine Übersicht über die Regulation der NK-Zellaktivität ist in Abbildung 1 dargestellt.

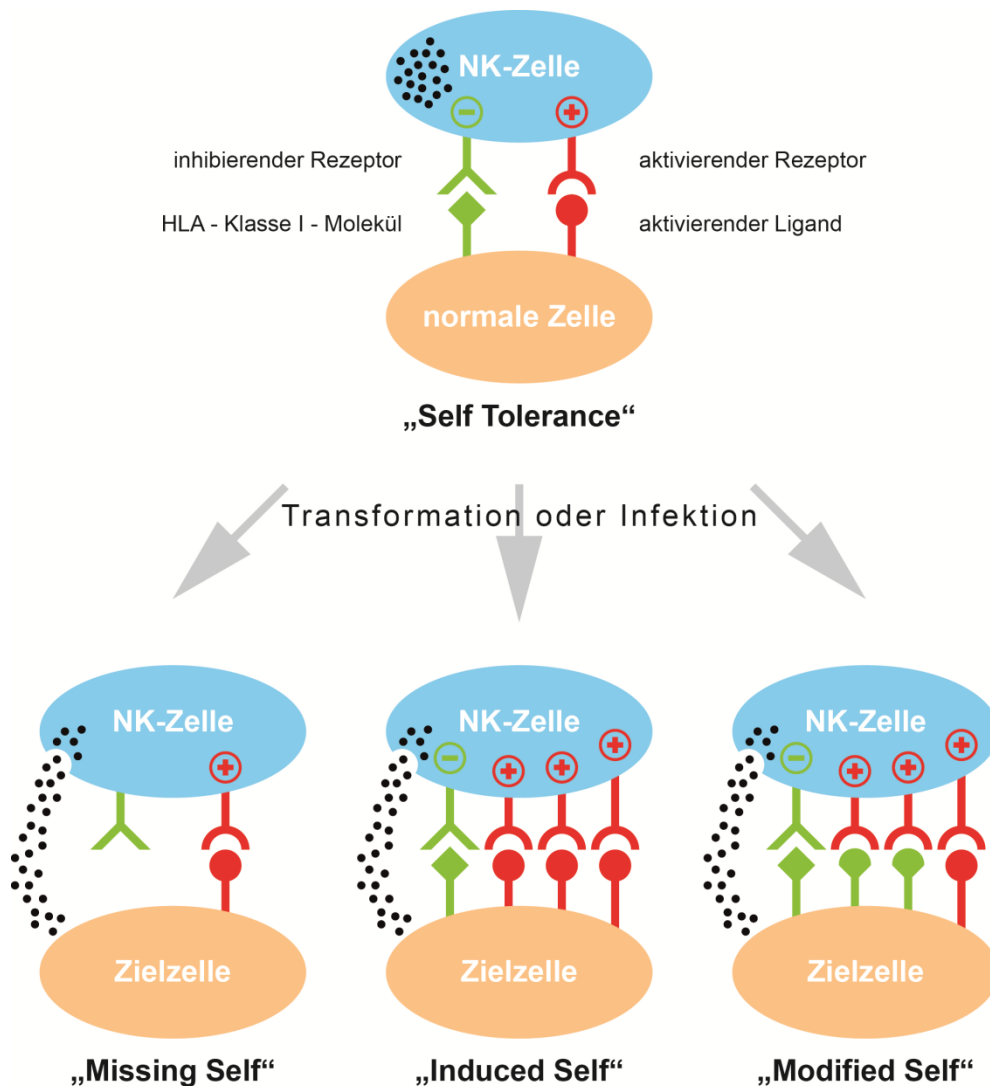


Abbildung 1: Regulation der NK-Zellaktivität durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen. Durch die Expression autologer HLA-Klasse I-Moleküle auf der Oberfläche gesunder Zellen dominieren die inhibierenden Signale, so dass die Effektorfunktionen der NK-Zellen gehemmt werden („Self Tolerance“). Hingegen erfolgt in virusinfizierten oder transformierten Zellen eine reduzierte oder keine HLA-Klasse I-Expression („Missing Self“) oder es werden modifizierte HLA-Klasse I-Moleküle exprimiert („Modified Self“), so dass die aktivierenden Signale überwiegen und die NK-Zelle aktiv wird. Dies geschieht ebenso, wenn stressinduzierte, aktivierende Liganden verstärkt auf der Zielzelloberfläche exprimiert werden („Induced Self“).

1.2 NK-Zell-basierte Immuntherapie

Die Immuntherapie stellt eine mögliche Krebsbehandlungsmethode dar, bei der die körpereigene Abwehr von Tumorzellen reaktiviert wird. Dabei liegt der Schwerpunkt klinischer Studien vorwiegend auf zytotoxischen T-Lymphozyten und nur im geringen Maße auf NK-Zellen (PubMed, Suchbegriff „Immuntherapie + CD8⁺ T-Lymphozyten bzw. primäre NK-Zellen“). Dies ist zum einen darin begründet, dass sich die NK-Zellisolation als

schwierig erweist und die aus dem Blut von Patienten aufgereinigten NK-Zellen nach ihrer *ex vivo* Stimulation teilweise nur eine begrenzte Zytotoxizität zeigen (Levy, Roberti & Mordoh, 2011). Zum anderen sind nur 5 % - 15 % der Zellen des peripheren Blutes NK-Zellen, so dass für adoptive Immuntherapien nach der Isolation zunächst eine hinreichende Anzahl aktivierter NK-Zellen durch Expansion gewonnen werden muss (Bourin *et al.*, 1993). Allerdings spricht für die Verwendung von NK-Zellen, dass sie im Gegensatz zu T-Lymphozyten unabhängig von einem vorangegangenen Antigenkontakt zytotoxisch aktiv werden und dabei natürlicherweise über verschiedene Mechanismen zur Abtötung von Tumorzellen verfügen (Caligiuri, 2008). Im Folgenden wird ein Überblick über einige NK-Zell-basierte Immuntherapien (Ljunggren & Malmberg, 2007; Terme *et al.*, 2008) und die damit einhergehenden klinischen Studien (Cheng *et al.*, 2013) gegeben.

Die Zytokin-basierten NK-Zelltherapien dienen der Differenzierung, Aktivierung und Expansion von NK-Zellen, um so deren Reaktivität gegenüber den Tumorzellen zu verbessern. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielen die Interleukine (IL)-2, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 (Becknell & Caligiuri, 2005; Colucci, Caligiuri & Di Santo, 2003), wobei im Mittelpunkt klinischer Studien die Gabe von IL-2, allein oder in Kombination mit IL-21, stand. Rosenberg und Mulé (1985) zeigten Behandlungserfolge bei Krebspatienten, denen *ex vivo* IL-2 aktivierte, zytotoxische Zellen, sogenannte LAK („Lymphokine-Activated Killer“-)Zellen, injiziert wurden und die parallel dazu eine systemische Gabe von IL-2 erhielten. Nachfolgende Studien verdeutlichten jedoch, dass der Behandlungserfolg stark abhängig war von der Krebsart und den Bedingungen, unter denen die IL-2-Gabe erfolgte (Atkins *et al.*, 2000; Passalacqua *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigt IL-2 starke toxische Nebenwirkungen, wie zum Beispiel die Schädigung von Blutgefäßen und das daraus resultierende Kapillarlecksyndrom (Baluna & Vitetta, 1997). Aufgrund dessen wird nunmehr Abstand von der systemischen IL-2-basierten Immuntherapie genommen. Auch die Gabe von IL-12 zeigte nur mäßigen Behandlungserfolg bei gleichzeitigem Auftreten von starken Nebenwirkungen (Colombo & Trinchieri, 2002). Dagegen lassen *in vivo* Studien auf die Eignung von IL-15 zur Behandlung verschiedener Tumore, wie Prostatakarzinom und Non-Hodgkin Lymphom, ohne starke toxische Nebenwirkungen schließen (Porrata *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2001).

Bei den Antikörper-basierten NK-Zellimmuntherapien werden zum einen humanisierte monoklonale Antikörper verwendet, die inhibitorische NK-Zellrezeptoren blockieren. Aufgrund dessen kommt es zur Ausbildung einer künstlichen „Missing Self“-Situation zwischen NK-Zellen und Tumorzellen, so dass die Tumorzellen trotz HLA-Klasse I-Expression von den NK-Zellen erkannt und abgetötet werden (Koh *et al.*, 2001). Die verwendeten Antikörper blockieren vorrangig die NK-Zellrezeptorgruppe der inhibitorischen KIR. Der wohl wichtigste Vertreter ist der gegen KIR2DL1, KIR2DL2 und KIR2DL3 gerichtete

Antikörper IPH2101 (1-7F9). Er wurde bereits in Phase I-Studien bei der Behandlung von multiplen Myelomen und der akuten myeloischen Leukämie (AML) als verträglich klassifiziert (Benson *et al.*, 2012; Vey *et al.*, 2012). Jedoch wurde in einer Phase II-Studie keine antitumorale Wirkung bei der alleinigen Gabe von IPH2101 in Patienten mit multiplen Myelom festgestellt (Korde *et al.*, 2014). Ein anderer Ansatz der Antikörper-basierten NK-Zellimmuntherapie ist die Gabe von monoklonalen oder bispezifischen Antikörpern, die die Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen vermitteln und im Anschluss daran zur NK-Zellaktivierung führen. Die eingesetzten monoklonalen IgG-Antikörper sind gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene gerichtet und binden diese Zielstrukturen auf der Tumoroberfläche. Ihre konstanten Regionen werden von dem aktivierenden NK-Zellrezeptor CD16 (FcγRIII) erkannt. Durch die Kreuzvernetzung von CD16 erfolgt die Induktion der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) in den NK-Zellen und daraus resultierend die Abtötung der Tumorzellen (Hellström *et al.*, 1988). Beispiele für in der Klinik zugelassene, monoklonale Antikörper sind der gegen CD20 gerichtete und bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzte Antikörper Rituximab und der HER2-spezifische Antikörper Trastuzumab, der bei der Therapie von Mammakarzinomen verwendet wird (Carter, 2006). Um eine verbesserte Aktivierung der NK-Zellen zu erhalten, wurden bispezifische Antikörper entwickelt. Diese sogenannten Diabodies bestehen aus zwei fusionierten Einzelkettenantikörperfragmenten, von denen eines Antigene auf der Tumoroberfläche erkennt und das andere aktivierende NK-Zellrezeptoren bindet. Beispiele hierfür sind B7-H6x7D8 (NKp30-Ligand und anti-CD20) und ULBP2x7D8 (NKG2D-Ligand und anti-CD20) sowie CD30xCD16a (Kellner *et al.*, 2012; Reiners *et al.*, 2013).

Im Rahmen der adoptiven NK-Zellimmuntherapie werden NK-Zellen isoliert, *ex vivo* aktiviert und expandiert und im Anschluss in den Patienten transferiert. Besonders vielversprechend ist dabei die allogene Immuntherapie mit haploidentischen, alloreaktiven NK-Zellen bei der Behandlung der akuten myelomischen Leukämie (AML) (Beelen *et al.*, 2005; Curti *et al.*, 2011). Bereits 1965 zeigten Mathé *et al.*, dass es dabei zur Ausbildung einer „Graft-versus-Leukemia“ (GvL)-Reaktion kam, bei der die Spender-NK-Zellen gegen die Tumorzellen des Empfängers zytotoxisch aktiv wurden. Diese Reaktion beruht auf der Diskrepanz („mismatch“) zwischen den KIR-Rezeptoren des Spenders und dem HLA-Typ des Empfängers (Ruggeri *et al.*, 1999). Dabei erkennen die KIR der Spender-NK-Zellen die Tumorzellen des Empfängers als „fremd“, wenn diese keinen passenden Liganden aufweisen. Neben dem Schutz vor Rezidivkrankungen durch die GvL-Reaktion ist weiterhin das Ausbleiben einer „Graft-versus-Host“ (GvH)-Reaktion bei der allogenen NK-Zellimmuntherapie von Vorteil (Ruggeri *et al.*, 2001). Bei dieser kommt es zu einer uner-

wünschten Reaktion der Spenderzellen gegen das gesunde Gewebe des Empfängers, wie es bei T-Zelltransplantationen häufig auftritt.

Eine relativ neue Strategie, um die antitumorale Wirkung der NK-Zellen bei der adoptiven Immuntherapie zu steigern, ist deren genetische Modifikation mit tumorspezifischen, chimären Antigenrezeptoren (CAR). Diese bestehen aus einem extrazellulären Einzelkettenantikörperfragment, das gegen tumorassoziierte oder -spezifische Antigene gerichtet und mit einem intrazellulären ITAM-tragenden Signaladaptermolekül, wie CD3- ζ , fusioniert ist (Eshhar *et al.*, 1993; Sadelain, Brentjens & Rivière, 2013). Die Funktionstüchtigkeit und antitumorale Wirkung solcher chimärer Antigenrezeptoren wurde bereits in präklinischen und klinischen Studien für zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen (Cartellieri *et al.*, 2010; Kochenderfer & Rosenberg, 2013). Bei der Armierung von NK-Zellen mit einem CAR wurden in *in vitro* und *in vivo* Studien vor allem die permanente NK-Zelllinie NK-92 (Boissel *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2008; Tassev, Cheng & Cheung, 2012), neben NKT (Oberoi & Wels, 2013) und YT (Schirrmann & Pecher, 2002), eingesetzt. Die Spezifität der CAR war dabei vorrangig gegen Antigene, wie CD19 (Imai, Iwamoto & Campana, 2005), CD20 (Müller *et al.*, 2008) und HER2 (Alkins *et al.*, 2013), gerichtet. Trotz der daraus resultierenden, aussichtsreichen Ergebnisse wurden primäre humane NK-Zellen hingegen nur in sechs Studien genetisch modifiziert und erfolgreich verwendet (Altvater *et al.*, 2009; Imai, Iwamoto & Campana, 2005; Kruschinski *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Pegram *et al.*, 2008; Shimasaki *et al.*, 2012). Ursache hierfür sind die eingangs beschriebenen Probleme bei der Bereitstellung ausreichender Mengen an zytotoxischen primären NK-Zellen.

1.3 Das Prostata-spezifische Stammzellantigen (PSCA) als tumorassoziiertes Antigen

Ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung neuer Immuntherapieansätze zur Tumorbehandlung ist die Schonung gesunder Gewebe und Organe. Dazu wird nach Zielstrukturen gesucht, die vorrangig auf Tumorzellen zu finden sind. Diese Tumorantigene lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die tumorassoziierten Antigene, die auch von gesunden Zellen exprimiert werden, und die tumorspezifischen Antigene, die nur auf Tumorzellen vorkommen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl solcher Tumorantigene identifiziert, unter anderem HER2 auf Brustkrebszellen (Milani *et al.*, 2013), CD19 auf Leukämie- und Lymphomzellen (Scheuermann & Racila, 1995), CD20 auf Non-Hodgkin-Lymphomzellen (Maloney, 2005) und PSCA auf Prostatakarzinomzellen (Wente *et al.*, 2005).

Das Prostata-spezifische Stammzellantigen (PSCA) wurde 1998 erstmalig von Reiter *et al.* als Oberflächenmarker von Prostatakarzinomzellen beschrieben. Es handelt sich dabei um ein 123 Aminosäuren großes Zellmembranglykoprotein, an dessen N-Terminus sich

eine Signalsequenz befindet. PSCA besitzt außerdem vielfältige *N*-Glykosylierungsstellen, wodurch das Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 24 kDa schwankt (Reiter *et al.*, 1998). Es gehört zur Thy-1/Ly-6 Familie der Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Oberflächenproteine. Ebenfalls Mitglied dieser Familie ist das Stammzellantigen Typ 2 (SCA-2), ein Oberflächenmarker unreifer Lymphozyten, welches eine 30%ige Homologie zu PSCA aufzeigt (Reiter *et al.*, 1998). Aufgrund dieser schwachen Homologie erhielt PSCA seinen Namen, obwohl es weder ein Stammzellmarker ist (Tran *et al.*, 2002) noch ausschließlich auf Prostatazellen exprimiert wird. Zwar wurde PSCA vorrangig in der basalen und sekretorischen Epithelschicht der Prostata nachgewiesen, jedoch wurde es auch im geringen Maße auf Zellen der Plazenta, Blase und Niere sowie auf neuroendokrinen Zellen des Magen-Darm-Traktes identifiziert (Cunha *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 1998).

Allerdings ist PSCA als tumorassoziiertes Antigen nur schwach auf Normalgewebe nachweisbar. Hingegen wird es maßgeblich auf Prostatakarzinomgewebe überexprimiert. In einer Studie von Gu *et al.* (2000) wiesen 94 % aller untersuchten primären Prostatakarzinome und alle Knochenmetastasen eine PSCA-Überexpression auf. Dabei korrelierte ein verstärktes PSCA-Expressionsniveau signifikant mit einem höheren Tumorstadium und einem schlechteren Verlauf der Tumorerkrankung. Letzteres wird durch die signifikante Korrelation zwischen der stärkeren PSCA-Expression und dem erhöhten Anteil Androgen-unabhängiger Prostatakarzinomzellen deutlich (Gu *et al.*, 2000). Diese entstehen aus den vormals Androgen-abhängigen Tumorzellen während der Tumorprogression oder durch die Hormonentzugsbehandlung und sind nahezu therapieresistent. Des Weiteren korreliert das PSCA-Expressionslevel positiv mit der Ausbildung von Metastasen (Gu *et al.*, 2000) Folglich kann PSCA bei Prostatakarzinomen als Marker für die Diagnose und Prognose sowie als Zielstruktur für die Behandlung eingesetzt werden.

Bei der Nutzung von PSCA als Zielstruktur für die Tumorbehandlung wurden bereits Antikörper gegen PSCA als auch gegen PSCA gerichtete Immunzellen verwendet. Ein Beispiel für die Antikörper-basierte Therapie ist die Behandlung von SCID-Mäusen mit monoklonalen Antikörpern gegen PSCA, in deren Prostata humane Prostatakarzinomzellen eingebracht wurden. Dies führte zur Inhibierung des Tumorwachstums und der Metastasierung sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit (Saffran *et al.*, 2001). Exemplarisch für die adoptive Immuntherapie ist die Generierung CD8⁺ T-Lymphozyten durch Morgenroth *et al.* (2007) zu erwähnen, die einen chimären Antigenrezeptor (CAR), bestehend aus einem Einzelkettenantikörper gegen PSCA und der CD3- ζ -Kette, exprimierten. Dabei wurde gezeigt, dass die CAR-armierte T-Lymphozyten *in vitro* PSCA-exprimierende Tumorzellen erkannten und zytotoxisch gegen diese aktiv wurden. Anhand dieser und vieler

weiterer *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurde PSCA als geeignete und sichere Zielstruktur zur Behandlung von Prostatakarzinomen bestätigt (Raff, Gray & Kast, 2009).

PSCA wird neben dem Prostatakarzinom auch in anderen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom (Argani *et al.*, 2001; Wente *et al.*, 2005), dem Urothelkarzinom (Amara *et al.*, 2001; Elsamman *et al.*, 2006a), dem Nierenzellkarzinom (Elsamman *et al.*, 2006b), dem Magenkarzinom (Sakamoto *et al.*, 2008) und dem Glioblastom (Geiger *et al.*, 2011) überexprimiert. Somit ist es nicht nur als Zielstruktur für die Immuntherapie von Prostatakarzinomen, sondern auch von sehr unterschiedlichen humanen Tumorerkrankungen geeignet.

Die Frage nach der Funktion von PSCA sowohl in normalen physiologischen Prozessen als auch in der Karzinogenese ist größtenteils noch ungelöst. In einer Studie von Moore *et al.* (2008) mit PSCA-Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass PSCA weder für die normale Entwicklung noch die für Urogenitalfunktion der Mäuse entscheidend ist. Auch wurde kein erhöhtes Krebsrisiko in diesen Mäusen nachgewiesen. Dabei weist murines PSCA eine 70%ige Homologie zum humanen PSCA auf (Reiter *et al.*, 1998). Jedoch scheint PSCA in Abhängigkeit vom zellulären Kontext sowohl Tumor-fördernde als auch -supprimierende Funktionen zu besitzen (Saeki *et al.*, 2010).

1.4 Biotin-Avidin-Bindung

Die nichtkovalente Bindung zwischen Biotin und Avidin stellt eine der stärksten und spezifischsten biologischen Bindungen dar, wobei die Affinität mit 10^{-15} M sehr hoch ist (Green, 1975). Damit ist sie wesentlich stärker als die Bindung eines Antikörpers an sein Epitop beziehungsweise eines Rezeptors an seinen Liganden. Außerdem erfolgt die Bindung von Biotin an Avidin sehr schnell und ist dann sehr stabil gegenüber äußeren Einflüssen, wie pH-Wert, Temperatur, organischen Lösungsmitteln und denaturierenden Chemikalien (Wilchek & Bayer, 1990).

Bei Biotin, das auch als Vitamin H oder B₇ bezeichnet wird, handelt es sich um ein 0,24 kDa großes, wasserlösliches Vitamin aus dem B-Komplex. Es wird von Pflanzen, den meisten Bakterien und einigen Pilzen synthetisiert und ist essentiell für alle Lebensformen (Chapman-Smith & Cronan, 1999b). Als Koenzym von Carboxylasen, wie der Propionyl-CoA-Carboxylase, ist es in humanen und tierischen Zellen an essentiellen Stoffwechselschritten beteiligt, wie der Fettsäurebiosynthese, dem Aminosäurestoffwechsel und der Glukoneogenese (Bonjour, 1985). Des Weiteren ist es in die epigenetische Genregulation involviert (Hassan & Zemleni, 2006).

Das Glykoprotein Avidin mit einem Molekulargewicht von 67 kDa ist ein Homotetramer, dessen jeweils 128 Aminosäuren große Untereinheiten je ein Biotinmolekül binden kön-

nen (DeLange & Huang, 1971). Avidin kommt im Eiklar von Vogel- und Amphibieneiern vor (Green, 1975). Aufgrund seiner starken Glykosylierungen, wobei 10 % der Molekülmasse von Avidin aus Kohlenhydraten besteht (Bruch & White, 1982), und seines hohen isoelektronischen Punkts von 10 - 10,5 durch seine basischen Ladungen bindet Avidin sehr unspezifisch (DeLange & Huang, 1971). Dies stellt einen großen Nachteil bei der zellbiologischen und proteinbiochemischen Anwendung der Biotin-Avidin-Bindung dar. Aus diesem Grund wurde im Jahr 2000 von Marttila *et al.* ein deglykosyliertes Avidin generiert, das durch den Austausch der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gegen neutrale und saure Aminosäuren einen nahezu neutralen isoelektronischen Punkt von 6,3 aufweist. Die Affinität gegenüber Biotin blieb dabei erhalten und entsprach der des natürlichen Avidins (Marttila *et al.*, 2000). Auf Grundlage dieser Arbeit wurden deglykosylierte und neutrale Avidin-Derivate mit einem Molekulargewicht von 60 kDa von Thermo Scientific und Belovo Chemicals entwickelt, die unter dem Namen Neutraavidin beziehungsweise NeutraLite Avidin erhältlich sind.

Das strukturell zu Avidin homologe Streptavidin ist ebenfalls ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, dessen jeweils 159 Aminosäuren große Untereinheiten jeweils eine Bindung mit einer Affinität von 10^{-14} - 10^{-15} M zu einem Biotinmolekül eingehen können (Chaiet & Wolf, 1964). Das aus *Streptomyces avidinii* isolierte Streptavidin weist im Gegensatz zu Avidin keinerlei Glykosylierungen auf und hat einen neutralen isoelektronischen Punkt von 6,8 - 7,5, wodurch es wesentlich spezifischer als Avidin bindet (Chaiet & Wolf, 1964). Es ersetzte daher Avidin in vielen Biotin-Avidin-Technologien. Jedoch hat die Verwendung von Streptavidin im Vergleich zu Avidin auch Nachteile. Zum einen ist sowohl seine natürliche als auch rekombinante Herstellung teurer (Marttila *et al.*, 2000), zum anderen besitzt es eine bakterielle Erkennungssequenz, das sogenannte RYD-Motiv. Dieses ähnelt dem RGD-Motiv des Fibronektins der Säugetierzelle, wodurch es an Integrine und andere Zelladhäsionsmoleküle binden kann und dadurch in histochemischen und zytochemischen Anwendungen unerwünschte Hintergrundsignale erzeugt (Alon, Bayer & Wilchek, 1990). Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit Neutraavidin verwendet.

Die Biotin-Avidin-Bindung wird in der Biochemie, der Immunologie, der Zellbiologie und der Biotechnologie genutzt (Diamandis & Christopoulos, 1991). Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Isolierung und Anreicherung von Proteinen, z.B. bei der Immunpräzipitation und Affinitätsaufreinigung. Dabei binden biotinylierte Antigene über Avidin an biotinylierte Antikörper beziehungsweise die aufzureinigenden biotinylierten Proteine an eine Avidinsäule. Des Weiteren wird die Biotin-Avidin-Bindung zur Detektion von Proteinen verwendet, wobei biotinylierte Primär- oder Sekundärantikörper über Avidin an die zu untersuchenden biotinylierten Proteine binden. Beispiele hierfür sind die Western Blot- und

FACS-Analyse, die Immunhistochemie oder die ELISA-Analyse („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“). Die Biotin-Avidin-Bindung wird nicht nur zur Isolierung, Aufreinigung und Analyse von biotinylierten Proteinen genutzt, sondern auch bei der Entwicklung neuer Krebsbehandlungsstrategien eingesetzt. In einer Studie von Urbanska *et al.* (2012) wurde ein neuartiger T-Zellrezeptor generiert. Dieser Biotin-bindende Immunrezeptor bestand aus der intrazellulären Domäne der humanen CD3- ζ -Kette, die über eine CD8 α -Transmembrandomäne mit einem extrazellulär modifizierten Avidin verbunden war. Die so modifizierten T-Zellen waren in der Lage unterschiedliche Tumorzellen zu erkennen und abzutöten, sobald diese mit biotinylierten Antikörpern gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene gekoppelt wurden. Durch die sich ausbildende Biotin-Avidin-Bindung zwischen T-Zellrezeptor und der von einem Antikörper gebundenen Tumorzelle kam es zur Aktivierung der T-Zelle. Die so modifizierten T-Zellen stellen somit eine universelle Strategie für die adoptive Immuntherapie von Krebserkrankungen dar, da sie gegen verschiedene Tumore eingesetzt werden können.

1.5 Die enzymatische Biotinylierung

Die Voraussetzung für die meisten Biotin-Avidin-Anwendungen ist der Vorgang der Biotinylierung. Er bezeichnet die chemische oder enzymatische Bindung von Biotin an Proteine oder andere Makromoleküle. Bei der enzymatischen Biotinylierung sind zum einen die Koexpression oder die Zugabe einer Biotinproteinligase und zum anderen die Modifikation der zu biotinylierenden Zielstruktur mit einem Biotinakzeptorpeptid erforderlich. Dadurch erfolgt im Gegensatz zur chemischen Biotinylierung eine spezifische Bindung von Biotin an das entsprechende Zellkompartiment.

1.5.1 Biotinproteinligase

Die Biotinproteinligase, auch als Holocarboxylase Synthetase bezeichnet, katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bindung von Biotin an einen spezifischen Lysinrest von neusynthetisierten Carboxylasen, die Biotin als Koenzym benötigen. Diese Reaktion erfolgt in zwei Schritten, bei denen eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotins und der ϵ -Aminogruppe des spezifischen Lysinrests ausgebildet wird (McAllister & Coon, 1966). Dabei handelt es sich um eine äußerst spezifische, post-translationale Modifikation, da jeder Organismus nur eine Biotinproteinligase besitzt (Chapman-Smith & Cronan, 1999b). Die Sequenzen der Biotinproteinligasen weisen zudem eine evolutionäre Konservierung in Bereichen auf, die der katalytischen Domäne zugeordnet und somit an der Biotinylierung beteiligt sind (Chapman-Smith & Cronan, 1999a; Tissot, Douce & Alban, 1997).

Die Interaktion zwischen Biotinproteinligasen und Biotinakzeptorpeptiden ist ebenfalls in der Natur stark konserviert, so dass auch eine Biotinylierung erfolgt, wenn diese beiden Komponenten aus verschiedenen Spezies stammen. So wiesen McAllister und Coon 1966 *in vitro* nach, dass bakterielle Biotinproteinligasen Biotinakzeptorpeptide höherer Eukaryonten biotinylierten. 1990 gelang dies Cronan auch *in vivo*.

Die am besten charakterisierte Biotinproteinligase ist die bakterielle BirA von *E. coli*, die neben der Biotinylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase der Regulation der Biotinbiosynthese als Transkriptionsrepressor dient (Barker & Campbell, 1981a und 1981b). BirA ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 35,5 kDa (Howard, Shaw & Otsuka, 1985). Sie besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne, die notwendig für die Repressorfunktion ist, einer zentralen katalytischen Domäne, die der Biotinylierung dient, und einer C-terminalen Domäne mit bisher ungeklärter Funktion (Wilson *et al.*, 1992). Zur besseren Expression der bakteriellen BirA in Säugetierzellen und damit einhergehend einer gesteigerten Biotinylierung *in vivo*, wurde eine humanisierte BirA von Mechold, Gilbert und Ogryzko (2005) generiert. Diese war codonoptimiert, wobei die meisten selten genutzten bakteriellen Codons durch häufig in humanen Zellen genutzte Codons ersetzt wurden. Dabei erfolgte ein Austausch von 89 der 966 Nukleotide.

Die humane Biotinproteinligase mit einem Molekulargewicht von 80,8 kDa weist homologe Bereiche in der katalytischen Domäne zur BirA von *E. coli* auf (Leon-Del-Rio *et al.*, 1995). Jedoch besitzt sie keine DNA-Bindungsdomäne, da Biotin anders als bei *E. coli* nicht selbst synthetisiert, sondern von außen zugeführt wird. Sie kommt sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien vor (Leon-Del-Rio *et al.*, 1995). Mutationen der humanen Biotinproteinligase führen zum Multiplen Carboxylase-Mangel, einer neonatalen, angeborenen Biotinstoffwechselstörung, die ebenfalls durch Mutationen in den Biotin-abhängigen Carboxylasen hervorgerufen werden kann (Wolf *et al.*, 1983).

1.5.2 Biotinakzeptorpeptide

Das Vorkommen von biotinylierten Proteinen in der Natur ist sehr selten. Fall entdeckte 1979, dass Bakterien ein bis drei biotinylierte Proteine besitzen, wobei *E. coli* nur ein solches Protein, das sogenannte „Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein“ (BCCP), eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase aufweist. Im Gegensatz dazu wurden in eukaryontischen Zellen vier bis fünf biotinylierte Proteine nachgewiesen (Chandler & Ballard, 1988; Nikolau, Wurtele & Stumpf, 1985), wobei es sich in Säugetierzellen um die vier metabolischen Schlüsselenzyme Acetyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase und β -Methyl-Crotonyl-CoA-Carboxylase handelt (Robinson *et al.*, 1983).

Die Biotinakzeptorpeptide bestehen aus einer evolutionär stark konservierten Aminosäuresequenz, die den zu biotinylierenden Lysinrest umgibt. Dabei ist dieser von zwei

Methioninen flankiert (MKM-Motiv) und befindet sich meist circa 35 Aminosäuren vom C-Terminus des Proteins entfernt (Cronan, 1990; Samols *et al.*, 1988). Die Sequenz der Biotinakzeptorpeptide umfasst dabei zwischen 75 und 80 Aminosäuren, wobei circa 35 bis 40 Aminosäuren auf jeder Seite des zu biotinylierenden Lysinrests vorhanden sind (Cronan, 1990; Leon-Del-Rio & Gravel, 1994; Li & Cronan, 1992).

Jedoch sind weit weniger Aminosäuren ausreichend, um eine stabil gefaltete, funktionelle Biotindomäne zu erhalten. Schatz durchsuchte 1993 große Peptidbibliotheken, wobei er ein 23 Aminosäuren-umfassendes „Konsensuspeptid“ für die BirA-vermittelte Biotinylierung in *E. coli* identifizierte. Diese Konsensussequenz des Biotinakzeptorpeptids wurde sowohl N-terminal als auch C-terminal mit einer Vielzahl von Proteinen fusioniert, die wiederum *in vitro* wie *in vivo* biotinyliert wurden (Altman *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 1998; Tatsumi *et al.*, 1996; Tsao *et al.*, 1996). In einer späteren Studie von Beckett, Kovaleva und Schatz (1999) wurde gezeigt, dass ein Minimum von sogar nur 15 Aminosäuren dieser Konsensussequenz (GLNDIFEAQK*IEWHE) für die meisten Anwendungen ausreichend ist. Diese Biotinakzeptorpeptidsequenz wird kommerziell in der Avitag Technologie von Avidity genutzt. Neben der Identifizierung bakterieller Konsensuspeptide erfolgte auch die Untersuchung eukaryontischer Biotinakzeptorpeptide. So identifizierten Leon-Del-Rio und Gravel 1994 eine C-terminal gelegene, 67 Aminosäuren lange Sequenz der α -Untereinheit der humanen Propionyl-CoA-Carboxylase, die der Biotinylierung dient. Dabei erwiesen sich Mutationen in einigen konservierten Glycinresten und im PMPG-Motiv in der unmittelbaren Nähe des zu biotinylierenden Lysinrests als kritisch. In diesen Fällen war keinerlei Biotinylierung mehr nachweisbar.

1.5.3 Nutzungen der enzymatischen Biotinylierung

Die enzymatische Biotinylierung von Proteinen durch die Zugabe der Biotinproteinligase beziehungsweise deren Koexpression ist eine grundlegende Voraussetzung bei einer Vielzahl von Anwendungen, bei denen die Ausnutzung der sehr starken Biotin-Avidin-Bindung erfolgt. Dabei werden zum Großteil die Biotinproteinligase BirA und die vom Biotinakzeptorpeptid von *E. coli* abgeleiteten Konsensussequenzen eingesetzt.

Das wohl umfangreichste Anwendungsgebiet ist die Detektion von Proteinen. In einer Studie von Howarth *et al.* (2005) wurden Zelloberflächenproteine von verschiedenen lebenden Säugetierzellen, darunter humane HeLa-Zellen und Neuronen, die das von Beckett, Kovaleva & Schatz (1999) publizierte, minimale Konsensuspeptid trugen, durch eine dem Medium zugegebene BirA biotinyliert. Durch die anschließende schnelle, langlebige und spezifische Bindung von Streptavidin-gekoppelten Farbstoffen wurden Zeitrafferaufnahmen dieser biotinylierten Zelloberflächenproteine auf der lebenden Zelle durchgeführt. Kimura *et al.* entwickelten 2010 einen ELISA, bei dem biotinylierte Antigene ge-

nutzt wurden, um Antikörper im Serum von DNA-immunisierten Mäusen zu detektieren. Die Generierung der biotinylierten Antigene erfolgte dabei in humanen HEK293T-Zellen, die eine humanisierte BirA (HuBirA) koexprimierten. Jedoch wurden im Vergleich zur Studie von Mechold, Gilbert und Ogryzko (2005) sogar 234 von 966 Nukleotiden ausgetauscht, um eine noch bessere Codonoptimierung und damit eine gesteigerte Expression der BirA zu erreichen. Die verwendete Biotinakzeptorpeptidsequenz der Antigene, bestehend aus 23 Aminosäuren (MSGLNDIFEAQK*IEWHEGAPSSR), wurde von der von Schatz (1993) publizierten Biotinkonsensussequenz abgeleitet.

1.6 Zielsetzung

Trotz der Behandlung von Krebserkrankungen durch die operative Entfernung des Tumors und der anschließenden Chemo- und/oder Radiotherapie kommt es bei einer Vielzahl der Patienten zu einer Wiederkehr des Tumors (Rezidiv). Das Rezidiv entsteht dabei aus Tumorzellen, die bei der Operation nicht entfernt wurden (minimale Resterkrankung) oder sich in anderen Geweben und Organen ausgehend vom Primärtumor angesiedelt haben (Tumormetastasen). Aufgrund von tumoralen Immunevasionsmechanismen und der Ausbildung von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Therapeutika ist die Behandlung des Rezidivs im Vergleich zum Primärtumor wesentlich erschwert. Dies führt zu einer schlechteren Prognose für die Patienten. Um die Ursache des Rezidivs, das heißt die verbleibenden Tumorzellen, zu eliminieren, wurden in den letzten Jahren zelluläre Immuntherapiestrategien entwickelt. Eine erfolgversprechende Strategie ist die Generierung von tumorspezifischen, zytotoxischen Immuneffektorzellen, zum Beispiel CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen, durch die genetische Modifikation mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR). Dieser setzt sich zusammen aus einem Einzelkettenantikörper, der gegen tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene gerichtet ist, und einer aktivierenden Signaldomäne, die nach Antigenkontakt eine zytotoxische Reaktion der Immuneffektorzelle gegenüber der Tumorzelle vermittelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es NK-Zellen mit einem PSCA-spezifischen CAR zu armieren und ihre spezifische Immunantwort gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen zu überprüfen. Anhand der resultierenden Ergebnisse sollte deren potenzielle Eignung zur Behandlung humaner, PSCA-exprimierender Tumore eingeschätzt werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Im Hauptteil der Arbeit sollte der CAR NKp46- α PSCA generiert werden, der erstmalig aus dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 und seinem assoziierten Signaladaptermolekül CD3- ζ sowie dem etablierten PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörper α PSCA (Morgenroth *et al.*, 2007) besteht. Dieser sollte durch lentiviralen Gentransfer sowohl in die permanente NK-Zelllinie YTS als

auch in primäre humane NK-Zellen eingebracht werden. Im Anschluss galt es die Funktionalität des CAR und die damit einhergehende selektive Immunantwort der NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen nachzuweisen. Dazu sollten *in vitro* Experimente durchgeführt werden, mit deren Hilfe die spezifische Zytotoxizität, die Expression von CD107a als Degranulationsmarker und die Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ nach Antigenkontakt überprüft werden konnte. Nach erfolgreichem Abschluss dieser Arbeiten bestand die Aufgabe darin einen neuartigen CAR zu entwickeln, bei dem der Einzelkettenantikörper und folglich die Spezifität gegenüber Tumorantigenen austauschbar ist. Die so modifizierten NK-Effektorzellen könnten daher universell gegen verschiedene Tumore eingesetzt werden. Dazu galt es den biotinylierbaren NKp46-NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP zu generieren, der durch lentiviralen Gentransfer in die permanente NK-Zelllinie YTS eingebracht werden sollte. Im Anschluss bestand die Aufgabe darin die Biotinylierung von NKp46-KiBAP entweder exogen durch die Zugabe einer Biotinproteinligase zum Medium oder endogen durch die Koexpression einer Biotinproteinligase zu überprüfen. Darauf aufbauend galt es unter Ausnutzung der sehr starken Biotin-Avidin-Bindung die Assoziation mit einem Einzelkettenantikörper nachzuweisen. Dazu sollte exemplarisch der gegen PSCA gerichtete, biotinylierbare Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP von Stefanie Tietze (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) verwendet werden.

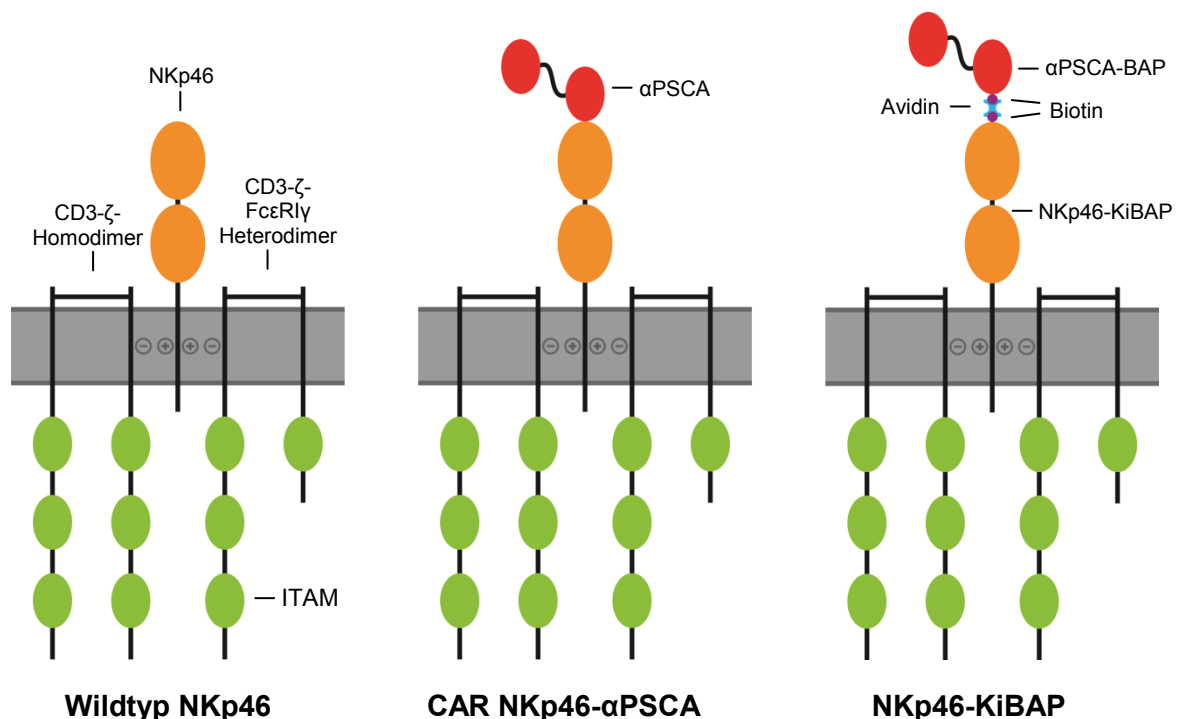


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wildtypform von NKp46, des generierten CAR NKp46- α PSCA und des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP mit dem über Biotin-Avidin gebundenen Einzelkettenantikörper gegen PSCA α PSCA-BAP. Des Weiteren sind die assoziierten Signaladaptermoleküle CD3- ζ -Homodimer und CD3- ζ -Fc ϵ R1 γ -Heterodimer dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

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

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Name	Hersteller	Stammlösung	Arbeitslösung	Verwendung
Ampicillin	Sigma	100 mg/ml	100 µg/ml	Selektion von <i>E. coli</i>
Hygromycin B	Invitrogen	50 mg/ml	200 µg/ml bei HEK293T	Selektion von eukaryontischen Zellen (Lagerung bei 4 °C)
Penicillin	Gibco	10.000 IU/ml	100 IU/ml	sterile Zellkultur
Puromycin	Clontech	50 mg/ml	10 µg/ml bei NK-Zellen 13 µg/ml bei YTS 20 µg/ml bei HEK293T	Selektion von eukaryontischen Zellen
Streptomycin	Gibco	10 mg/ml	100 µg/ml	sterile Zellkultur
Zeocin	Invitrogen	50 mg/ml	500 µg/ml	Selektion von eukaryontischen Zellen

2.1.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt. Die Primärantikörper für die Western Blot-Analysen (WB) wurden mit Blockierungslösung (Tabelle 12) verdünnt. Die Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS) wurden mit PBS verdünnt. Für die Sekundärantikörper wurden entsprechend die Verdünnungslösungen der Primärantikörper verwendet. Die Lagerung der Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben entweder bei 4 °C oder -20 °C.

Für die Biotinylierungsexperimente wurde mir freundlicherweise der bereits biotinylierte Einzelkettenantikörper gegen PSCA (α PSCA-BAP) von Stefanie Tietze (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) zur Verfügung gestellt. Dieser wurde in mit dem Expressionsvektor pSecTag2B-AM1BAP transient transfizierten HEK293T-HuBirA-Zellen produziert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. In der dritten Spalte ist zusätzlich zur Verdünnung angegeben, ob der Antikörper bei der Western Blot-Analyse (WB) oder bei der Durchflusszytometrie (FACS) Verwendung fand.

Name	Quelle	Verdünnung	Hersteller (Klon, Katalognummer)
anti- α -Tubulin	Maus, polyklonal	1:3000 (WB)	Santa Cruz (Klon DM1A, #sc-32293)
anti-CD3-zeta	Maus, IgG1, monoklonal	1:500 (WB)	BD (Klon 8D3, #551034)
anti-VSV-G	Maus, IgG1, monoklonal	1:5000 (WB)	Santa Cruz (Klon P5D4, #sc-66180)
anti-PSCA	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	Institut für Immunologie, TU Dresden (Hybridomaüberstand, Klon 7F5)
anti-CD3-FITC	Maus, IgG2a, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon BW264/56, #130-080-401)
anti-CD16-PE	Maus, IgG1 κ , monoklonal	1:20 (FACS)	eBioscience (Klon B73.1, #12-0167-41)
anti-CD56-APC / PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon AF12-7H3, #130-090-843 / 755)
anti-CD107a-PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon H4A3, #130-095-515)
anti-HLA-ABC-FITC	Maus, IgG1, monoklonal	1:20 (FACS)	BD (Klon G46-2.6, #555552)
anti-HLA-E-PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:20 (FACS)	eBioscience (Klon 3D12, #12-9953)
anti-FasL (CD95L)	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	Novus (Klon 14C2, #NB100-63072)
anti-FasR (CD95)	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	BD (Klon DX2, #555671)
anti-NKp46-PE (CD335)	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon 9E2, #130-092-607)
anti-MIC A/B	Maus, IgG2a, monoklonal	1:50 (FACS)	R&D (Klon 159207, #MAB13001)
anti-c-myc-Biotin / FITC	Maus, IgG1, monoklonal	1:15 (FACS)	Miltenyi (Klon SH1-26E7.1.3, #130-092-471 / 2)
anti-TRAIL (CD253)	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	BD (Klon RIK-1, #550517)
anti-TRAIL-R1 (CD261)	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	Acris (Klon B-N36, #AM31248PU-N)
anti-TRAIL-R2 (CD262)	Maus, IgG1, monoklonal	1:50 (FACS)	Biologend (Klon DJR2-2, #307302)
Isotypkontrolle-APC / FITC / PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon IS5-21F5, #130-092-214 / 3 / 2)
Isotypkontrolle-FITC	Maus, IgG2a, monoklonal	1:50 (FACS)	Immunotools (Klon X5563, #21815021)
Isotypkontrolle-PE	Maus, IgG1 κ , monoklonal	1:20 (FACS)	eBioscience (Klon P3.6.2.8.1, #12-4714)
Isotypkontrolle pure	Maus, IgG1 κ , monoklonal	1:50 (FACS)	BD (Klon MOPC-21, #555746)

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. In der dritten Spalte ist zusätzlich zur Verdünnung angegeben, ob der Antikörper bei der Western Blot-Analyse (WB) oder bei der Durchflusszytometrie (FACS) Verwendung fand.

Name	Quelle	Verdünnung	Hersteller (Klon, Katalognummer)
anti-Biotin-APC	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-856)
anti-Biotin-FITC	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-857)
anti-Biotin-PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11 (FACS)	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-756)
anti-Maus-IgG-(H+L)-Cy3	Ziege, polyklonal	1:50 (FACS)	Jackson ImmunoResearch (#115-166-003)
anti-Kaninchen-HRP	Ziege, polyklonal	1:2000 (WB)	Dako (#P0448)
anti-Maus-HRP	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (WB)	Dako (#P0447)

2.1.3 Bakterienstamm

Es wurde der Stamm *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) mit dem Genotyp $F'\{lacI^q, Tn10(Tet^R)\} mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$ genutzt.

2.1.4 Chemikalien

Die Lagerung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien erfolgte, falls nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden

Name	Verwendung
Agarose	Herstellung von DNA-Gelen
Acrylamid / Bis-Solution (29:1)	Herstellung von Proteingelen (Lagerung 4 °C)
6-Aminocapronsäure	Herstellung von Kathodenpuffer
Ammoniumperoxodisulfat (APS, w/v, 10 %)	Vernetzung von Acrylamid (Lagerung 4 °C)
Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“, BSA)	Abdeckung unspezifischer Proteininteraktionen (Lagerung 4 °C)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lösen von Substanzen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Herstellung von Puffern
Eisessig	Herstellung von Puffern
Ethanol	Waschen von DNA, Herstellung von Puffern
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Markierung von DNA im Agarosegel
Injektionswasser	Verdünnung von Lösungen, Lösen von DNA und RNA

Name	Verwendung
Isopropanol	Ausfällung von DNA
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 40 μ g/ml)	Blau-Weiß-Selektion (Lagerung bei -20 °C)
β -Mercaptoethanol	Ablösen von Antikörpern von PVDF-Membranen
Methanol	Aktivierung der PVDF-Membran
Milchpulver	Abdecken unspezifischer Proteininteraktionen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Abdecken von Proteinladungen bei der Gelelektrophorese
Ponceau S (1 %, gelöst in 3%iger Trichloressigsäure)	Anfärben von Proteinen auf PVDF-Membranen
Tetramethylethyldiamin	Vernetzung 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 6: Übersicht der Chemikalien und Substanzen für die zellbiologischen Arbeiten

Name	Verwendung
Biotin	Biotinylierung von Zellen
Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“, BSA)	Durchflusszytometrie (Lagerung 4 °C)
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Lebendfarbstoff für Proliferationsanalysen
Cr ⁵¹ -Radionuklid	Markierung von Zielzellen im Chrom-Freisetzungssassay
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lösung von Substanzen, Permeabilisierung von Zellen
Fötale Kälberserum (FKS)	Zellkulturmedien
2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Puffersubstanz für Zellkulturmedien
1x MEM Nichtessenzielle Aminosäuren (NEA)	Zellkulturmedien
Neutravidin	Verknüpfung des biotinylierten Rezeptors NKp46-KiBAP mit dem biotinylierten Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP
Szintillationsflüssigkeit	Messung der Radioaktivität im Chrom-Freisetzungssassay
Triton X-100	Permeabilisierung von Zellen

2.1.5 Enzyme

Die Enzyme wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
FastAP Alkaline Phosphatase	Thermosensitive Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	Fermentas
FastLink Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Epicentre Biotechnologies

Name	Verwendung	Hersteller
Lysozym	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, Aufbruch von Bakterienzellwänden bei Plasmid-Minipräparation	Fluka
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	PCR	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	Klonierung	Fermentas
RNase A	Plasmid-Mini- oder Midipräparation	Roche

2.1.6 Größenstandards

Die Größenstandards wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 8: Übersicht der Größenstandards

Name	Verwendung
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Nukleinsäurelängenstandard
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 - 250 kDa	Proteingrößenstandard

2.1.7 Inhibitoren

Tabelle 9: Übersicht der Inhibitoren

Name	Verwendung	Lagerung	Hersteller
Apoprotin	Proteaseinhibitor, 5 µg/ml	-20 °C	Roche
BX795	TBK1 / IKKε-Inhibitor bei NK-Zelltransduktion, SL 10 mM in DMSO, AL 2,5 µM	-20 °C	InVivoGen
Leupeptin	Proteaseinhibitor, 10 µg/ml	-20 °C	Roche
Monensin	Hemmung der Vesikelsekretion beim Degranulationsassay, SL 50 mM in Ethanol, AL 2 mM	-20 °C	Sigma
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2	Tyrosinphosphataseinhibitor, 1:100	4 °C	Sigma
RNase AWAY	Oberflächenbehandlung bei RNA-Isolation	Raumtemperatur	Molecular BioProducts

2.1.8 Kommerzielle Kits

Die kommerziellen Kits wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 10: Übersicht der kommerziellen Kits

Name	Verwendung	Hersteller
Fast-Link DNA Ligation Kit	DNA-Ligation (Lagerung bei -20 °C)	Epicentre Biotechnologies
DNase I Kit	Entfernung von genomischer DNA bei RNA-Isolation (Lagerung bei 4 °C)	Qiagen
GeneJET Gel Extraction Kit	Elution von DNA aus Agarosegelen	Thermo Fisher Scientific
GeneJET PCR Purification Kit	Aufreinigung von DNA	Thermo Fisher Scientific
GeneJET RNA Cleanup and Concentration Kit	Aufreinigung von RNA	Thermo Fisher Scientific
Human IFN- γ ELISA Set	Bestimmung der IFN- γ -Konzentration in Zellkulturüberständen (Lagerung bei 4 °C)	BD
Invisorb Plasmid Midi Kit	Plasmidisolation aus Bakterienkulturen	STRATEC Molecular
NK Cell Activation / Expansion Kit	Aktivierung und Expansion isolierter NK-Zellen (Lagerung bei 4 °C)	Miltenyi
NK Cell Isolation Kit	Isolation von NK-Zellen aus peripheren Blut (Lagerung bei 4°C)	Miltenyi
Pierce BCA Protein Assay Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung	Thermo Fisher Scientific
ProteoJET Membrane Protein Extraction Kit	Isolierung von Membranproteinen aus Säugerzellen	Fermentas
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription von RNA in cDNA	Thermo Fisher Scientific
RNeasy Plus Mini Kit	RNA-Isolation aus biologischen Proben	Qiagen
TA pCR2.1 Cloning Kit	Subklonierung von PCR-Fragmenten (Lagerung bei -20 °C)	Invitrogen

2.1.9 Lösungen und Puffer

Die Lagerung der Lösungen und Puffer erfolgte, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Tabelle 11: Übersicht der Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Name	Zusammensetzung	Verwendung
6x Ladepuffer	bezogen von Fermentas (Lagerung bei 4 °C)	Agarosegelelektrophorese
Natriumacetat	3 M gelöst in ddH ₂ O	Plasmid-Minipräparation
STET-Puffer	0,1 M NaCl 10 mM Tris/Cl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) 5 % Triton X-100	Plasmid-Minipräparation
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 5,7 % (v/v) Eisessig 50 mM EDTA (pH 8,0)	Agarosegelelektrophorese

Name	Zusammensetzung	Verwendung
TE-Puffer	10 mM Tris/Cl 1 mM EDTA (Einstellung auf pH 7,5 - 8,0)	Lösen von DNA
TFB1	100 mM RbCl ₂ 30 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin (Lagerung bei 4 °C)	Herstellung kompetenter Bakterien
TFB2	10 mM Na-3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % Glycerin (Lagerung bei 4 °C)	Herstellung kompetenter Bakterien

Tabelle 12: Übersicht der Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Arbeiten

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
Blockierungslösung	5 % Milchpulver in 1x TBS	Abdeckung unspezifischer Proteininteraktionen
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
5x Laemmli-Puffer	60 mM Tris-Cl (pH 6,8) 2 % SDS 10 % Glycerin 5 % β-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau (Lagerung bei -20 °C)	Denaturierung von Proteinen und Auftrag dieser auf SDS-Gele
Luminata Forte Western HRP Substrate	bezogen von Millipore	Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen
RIPA-Lysepuffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ (v/v) 1 % Triton X-100 (Lagerung bei 4 °C)	Lyse von Zellen
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	1,5 M Tris-HCl (Lagerung bei 4 °C)	SDS-Page
10x SDS-Laufpuffer	10x SDS-Laufpuffer 14,4 % Glycin 1 % SDS 6 % Tris-Base	SDS-Page
Stripping-Puffer (pH 7,0)	62,5 mM Tris-HCl 2 % SDS 0,7% β-Mercaptoethanol	Ablösung von Antikörpern von PVDF-Membranen

Name	Zusammensetzung	Verwendung
10x TBS (pH 7,5)	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl	Waschen der PVDF-Membranen
1x TBS-T	1x TBS 0,2 % Triton X-100 (v/v)	Waschen der PVDF-Membranen
1x TBS-TT	1x TBS 0,2 % Triton X-100 (v/v) 0,05 % Tween 20 (v/v)	Waschen der PVDF-Membranen
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl (Lagerung bei 4 °C)	SDS-Page

Tabelle 13: Übersicht der Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten. SL: Stammlösung, AL: Arbeitslösung

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Biocoll Ficoll Separating Solution	bezogen von Merck Millipore	NK-Zellisolierung
Biotinlösung	100 mM in Aqua dest mit 3 % 5 M NaOH, 0,2 µm steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Biotinylierung von Zellen
Blockierungslösung	1 % BSA in PBS (w/v) (Lagerung bei 4 °C)	Antikörperfärbung
Natriumbutyrat	SL 500 mM in PBS, AL 10 mM, 0,2 µm steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Virusproduktion
1x PBS (Phosphate Buffered Saline)	bezogen von Gibco, ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ (Lagerung bei 4 °C)	Waschen von Zellen
Polybren	10 mg/ml, 0,2 µm steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Virusproduktion
Polyethylenimin-Lösung (PEI)	SL 100 mg/ml, AL 1 mg/ml, 0,45 µm steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Transfektion
Trypanblau	0,4 % in 0,9 % NaCl-Lösung	Vitalfarbstoff zur Zellzählung
Trypsin / EDTA (0,05 %)	bezogen von Gibco (Lagerung bei 4 °C)	Ablösen von adhären Zellen

2.1.10 Medien

Alle Medien wurden bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Bakterienkultivierungsmedien autoklaviert (20 Minuten bei 121 °C).

Tabelle 14: Übersicht der Bakterienkultivierungsmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; flüssig; pH 7,0)	1,0 % (w/v) Bacto Trypton (pH 7,2) 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Hefe-Extrakt 1,0 % (w/v) NaCl eventuell Zugabe von Antibiotikum
LB-Agar (Luria-Bertani-Agar, fest)	LB-Medium 1,5 % (w/v) Bacto Agar eventuell Zugabe von Antibiotikum
2x YT-Medium (2x Yeast Extract and Tryptone Medium; pH 7,5)	1,6 % (w/v) Bacto Trypton 1,0 % (w/v) Bacto Yeast Hefe-Extrakt 1,0 % (w/v) NaCl kurz vor Gebrauch Zugabe von: 20 mM MgSO ₄ 10 mM KCl

Tabelle 15: Übersicht der Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
α -MEM (komplett)	modifiziertes Minimum Essential Medium (Lonza) und zusätzlich: 20 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
BME (komplett)	Basal Medium Eagle (Gibco) und zusätzlich: 10 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 10 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 1x MEM NEA 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
CellGro SCGM (ohne)	CellGro GMP Serum-free Stem Cell Growth Medium (Cellgenix)
CellGro SCGM (komplett)	CellGro (ohne) und zusätzlich: 10 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 1000 IU/ml Proleukin S (Novartis, gentechnisch erzeugtes IL-2 aus <i>E. coli</i>) 20 ng/ml IL-21 (Miltenyi)
DMEM (ohne)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) mit 4,5 g/l Glukose, Natriumpyruvat und L-Glutamin
DMEM (komplett)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 10 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 10 mM HEPES 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
DMEM (15 %)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 15 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 10 mM HEPES 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

Name	Zusammensetzung
DMEM (1x MEM NEA)	DMEM (komplett) und zusätzlich: 1x MEM NEA
Kryokonservierungsmedium	10 % DMSO in hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS)
RPMI-1640 (ohne)	Roswell Park Memorial Institute Medium (Gibco)
RPMI-1640 (komplett)	RPMI-1640 (ohne) und zusätzlich: 10 % hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) 10 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

2.1.11 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von Eurofins MWG Operon bezogen und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Klonierungsarbeiten. Die Erkennungssequenzen für die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind **fett** und die nicht-homologen AT-Sequenzen sind dünn dargestellt. Die Schnittstelle eines Restriktionsenzym wurde mit einem ^ gekennzeichnet. Die restlichen Bestandteile wurden farbig markiert.

Name	Sequenz 5'→3'	Länge [bp]	Tm [°C]	Bestandteile
CD3-zeta-I-for	ATAT gtt [^] acc GAACAAAACT CATCTCAGAAGAGGATCTGAAT ggaggatctggaggatctACCG CGGCCATCTGCAGGC	81	>75	HpaI , Myc-Tag, Gly-Ser-Linker, N-Terminus der CD3-zeta-Kette
CD3-zeta-I-rev	ATAT gc [^] ggccgc TTAGCGAGG GGGCAGGGCCTG	33	>75	NotI , C-Terminus der CD3-zeta-Kette
NKp46-kurz-for	ATATA [^] ccggt GCCACCATGTC TTCCACACTC	31	69,5	AgeI , KOZAK-Sequenz, N-Terminus von NKp46
NKp46-kurz-rev	ATAT c [^] ggccg AGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTAagatcc tccagatcctccAACCAGGAAC CACACTAGAGCCACCAGGAC	85	>75	EagI , HA-Tag, Gly-Ser-Linker, C-terminaler Bereich von NKp46
MECL1-GCA1-for	GCTTACTCCACCTCCATAGCC	21	58	N-terminaler Bereich von MECL-1 zur Überprüfung von cDNA
MECL1-YS1-rev	CTGGCGGTGCTAGAAGACC	19	55	C-terminaler Bereich von MECL-1 zur Überprüfung von cDNA
PSCA-kurz-for	ATATAT gcatg [^] c AAACCGTTC ATCTGGGCCGAG	33	69,5	SphI , N-terminaler Bereich von NKp46

Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierungen

Name	Sequenz 5'→3'	Länge [bp]	Verwendung
Ig-kappa-Seq	TACACCAGGTGAGGGCAGAG	20	Überprüfung des Selektionsmarkers Puromycin bzw. EGFP in pHATrick
lacZ-for	CGGGCCTCTTCGCTATTACG	20	Überprüfung von Inserts in pUC57
MCS2_rev	CCGCATGTTAGAAGACTTCCT CTGCCCTC	29	Überprüfung von Inserts in pHATrick-MCS-T2A
M13-rev	GGAAACAGCTATGACCATG	19	Überprüfung von Inserts in pCR2.1
NKp46-for	AAACCGTTCATCTGGGCCGA	20	Überprüfung von NKp46-Konstrukten
NKp46-rev	GAAGAGTCTGTGTGTTTCAGC	20	Überprüfung von NKp46-Konstrukten
p6NST1-for	GGGGGTACAGTGCAGGGG	18	Überprüfung von Inserts in pHATrick-MCS-T2A
p6NST50-AM1-Igkappa-for	CCCCAGATATGGCCCAACCCCT CAG	24	Überprüfung von Inserts in p6NST50
p6NST50-rev	GCATTTCCTAGGGTCTTTCCCC	22	Überprüfung von Inserts in p6NST50
scFv(PSCA)-seq	CAGACACACTCCTGCTATGG	20	Überprüfung von NKp46-αPSCA-Konstrukten
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	20	Überprüfung von Inserts in pCR2.1

2.1.12 Plasmide

Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide. Amp^R: Ampicillinresistenz, CAR: chimärer Antigenrezeptor, Kan^R: Kanamycinresistenz, MCS: „Multiple Cloning Site“, Puro^R: Puromycinresistenz, Zeo^R: Zeocinresistenz

Name	Beschreibung (Referenz)
pCD/NL-BH	lentiviraler Expressionsvektor für das Gag-Pol-Polyprotein von HIV-1, CMV-Promotor und Amp ^R (Lindemann) ¹
pCR2.1	Klonierungsvektor aus dem TA pCR2.1 Cloning Kit (Invitrogen) mit 5'-Abschnitt des LacZ-Gens, der eine MCS enthält, Amp ^R und Kan ^R
pcz-VSV-G	Expressionsvektor mit dem Env-Glykoprotein G des „ <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> “, CMV-Promotor und Amp ^R (Lindemann) ¹
pHATrick-HuBirA-Sy-Puro	lentiviraler Expressionsvektor mit der codonoptimierten, humanisierten Biotinproteinligase HuBirA, Puro ^R und Amp ^R (Tietze) ²
pHATrick-αPSCA-DAP12-EGFP bzw. -Puro ^R	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-EGFP bzw. -Puro ^R , mit zusätzlichen Igκ-Signalpeptid, einer KOZAK-Sequenz und dem CAR αPSCA-DAP12 bestehend aus dem Einzelkettenantikörper gegen PSCA und der intrazellulären Signaluntereinheit DAP12 (Töpfer) ²
p6NST50-myc-DAP12	lentiviraler Expressionsvektor mit Igκ-Signalpeptid, myc-Epitop, intrazellulärer Signaluntereinheit DAP12, IRES, EGFP und Zeo ^R (Töpfer) ²

¹ TU Dresden, Institut für Virologie

² Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, AG Experimentelle Neurochirurgie / Tumormimmunologie

Tabelle 19: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren. Amp^R: Ampicillinresistenz, CAR: chimärer Antigenrezeptor, MCS: „Multiple Cloning Site“, Puro^R: Puromycinresistenz

Name	Beschreibung (Referenz)
pCR2.1-NKp46-CDS	prokaryontischer Expressionsvektor, basierend auf pCR2.1, mit dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 (MWG)
pUC57-NKp46-KiBAP	prokaryontischer Expressionsvektor mit dem 5'-Abschnitt des LacZ-Gens, der eine MCS enthält, Amp ^R und dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP (MWG)
pHATrick-NKp46-CDS-Puro ^R /-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-MCS-T2A-Puro ^R /EGFP, mit zusätzlichem Ig κ -Signalpeptid und dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46
pHATrick-NKp46-CDS-k-Puro ^R /-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-MCS-T2A-Puro ^R /EGFP, mit zusätzlichem Ig κ -Signalpeptid und dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46, dessen intrazellulärer Bereich deletiert wurde
pHATrick-NKp46-KiBAP-Puro ^R /-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-MCS-T2A-Puro ^R /EGFP, mit zusätzlichem Ig κ -Signalpeptid und dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP
pHATrick-NKp46- α PSCA-Puro ^R /-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-MCS-T2A-Puro ^R /EGFP, mit zusätzlichem Ig κ -Signalpeptid und dem CAR NKp46- α PSCA bestehend aus dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 und dem Einzelkettenantikörper gegen PSCA
pHATrick-NKp46-k- α PSCA-Puro ^R /-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATrick-MCS-T2A-Puro ^R /EGFP, mit zusätzlichem Ig κ -Signalpeptid und dem CAR NKp46- α PSCA bestehend aus dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46, dessen intrazelluläre Domäne deletiert wurde, und dem Einzelkettenantikörper gegen PSCA
p6NST50-CD3-zeta	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf p6NST50-myc-DAP12, bei dem die intrazelluläre Signaluntereinheit DAP12 gegen die CD3- ζ -Kette ausgetauscht wurde

2.1.13 Software

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Software

Name	Verwendung	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Grafikerstellung	Adobe
Adobe Photoshop CS5	Bildbearbeitung	Adobe
ApE - A Plasmid Editor	Klonierungssimulation	Biology Labs
Clone Manager 9	Klonierungssimulation, Erstellung von Vektorkarten	Sci-Ed Software
Fast PCR	Überprüfung von Primern	Primer Digital
Flow Jo V10	Auswertung von FACS-Daten	Tree Star
Image J 1.48v	Densitometrie	National Institutes of Health
Microsoft Office 2007	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft
Zotero	Literaturverwaltung	Centre for History and New Media

2.1.14 Verbrauchsmittel

Die Verbrauchsmittel des täglichen Bedarfs wurden von Eppendorf, Greiner, Nunc und anderen Qualitätsherstellern von Laborbedarf bezogen. In Tabelle 21 werden nur spezielle Verbrauchsmittel aufgeführt.

Tabelle 21: Übersicht der speziellen Verbrauchsmittel

Name	Verwendung	Hersteller
Filterpapier	Western Blot	Whatman
Fluorotrans Transfer Membran (PVDF)	Western Blot	Whatman
Rundbodenplatten, 96-Well Culture Cluster (Polystyrene)	Chrom-Freisetzungssassay	Costar
Szintillationsplatten für 1450 MicroBeta (PET)	Chrom-Freisetzungssassay, Detektion der Radioaktivität	Perkin Elmer
Spitzbodenplatten, 96-Well	fluoreszenzzytometrische Antikörperfärbung	Nunc

2.1.15 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Zelllinien sind Bestandteil der Zelllinien-sammlung der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden.

Tabelle 22: Übersicht der verwendeten und erzeugten Zelllinien

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
HEK293T	DMEM (komplett)	Graham <i>et al.</i> , 1977	immortalisierte, humane, embryonale Nierenkarzinomzelllinie mit stabil integriertem großen T-Antigen des <i>Simian Virus 40</i> (SV-40)
HEK293T-HuBirA	DMEM (komplett)	Tietze ¹	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Hygromycin B-Selektion
HEK293T-HuBirA-NKp46-CDS-Puro	DMEM (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Hygromycin B-Selektion und Überexpression von NKp46 nach Puromycinselektion
HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro	DMEM (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Hygromycin B-Selektion und von NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP nach Puromycinselektion

¹ Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, AG Experimentelle Neurochirurgie / Tumorimmunologie

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
HEK293T-HuBirA-DAP12-CD94-NKG2C-KiBAP	DMEM (komplett)	Freudenberg, unter meiner Betreuung	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Hygromycin B-Selektion, von NKG2C mit dem Biotinakzeptorpeptid KiBAP und DAP12 nach Puromycinselektion sowie CD94 mit EGFP als Selektionsmarker
HEK293T-NKp46-CDS-Puro	DMEM (komplett)	Diese Arbeit	stabile Überexpression von NKp46 nach Puromycinselektion
HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro	DMEM (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression von NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP nach Puromycinselektion
HEK293T-PSCA	DMEM (komplett)	Bachmann ¹	stabile Expression von PSCA nach Geneticinselektion
HT1376	DMEM (1x MEM NEA)	Rasheed <i>et al.</i> , 1977	humanes Harnblasenkarzinom mit natürlicher PSCA-Expression
H4	BME (komplett)	Arnstein <i>et al.</i> , 1974	humanes, neuronales Gliom
H4-PSCA	BME (komplett)	Töpfer ²	stabile Expression von PSCA nach Geneticinselektion
Natürliche Killerzellen (NK)	CellGro SCGM (komplett)		humane, primäre Immunzellen, isoliert aus dem peripheren Blut von zwei gesunden Spendern
RT-4	DMEM (1x MEM NEA)	Rigby & Franks, 1970	humanes Harnblasenübergangszellkarzinom mit natürlicher PSCA-Expression
YTS	RPMI-1640 (komplett)	Eshhar, 1987	Subklon der humanen NK-Zellleukämiezelllinie YT
YTS-CD3-ζ	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion
YTS-CD3-ζ-NKp46-CDS-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion und Überexpression von NKp46 nach Puromycinselektion
YTS-CD3-ζ-NKp46-CDS-k-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion und eines intrazellulär verkürzten NKp46 nach Puromycinselektion
YTS-CD3-ζ-NKp46-KiBAP-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion und von NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP nach Puromycinselektion
YTS-CD3-ζ-NKp46-αPSCA-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion und des CAR NKp46-αPSCA nach Puromycinselektion
YTS-CD3-ζ-NKp46-k-αPSCA-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der CD3-ζ-Kette nach Zeocinselektion und eines intrazellulär verkürzten CAR NKp46-αPSCA nach Puromycinselektion
YTS-NKp46-CDS-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Überexpression von NKp46 nach Puromycinselektion
YTS-NKp46-CDS-k-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression eines intrazellulär verkürzten NKp46 nach Puromycinselektion

¹ TU Dresden, Institut für Immunologie

² Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, AG Experimentelle Neurochirurgie / Tumormimmunologie

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
YTS-NKp46-KiBAP-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression von NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP nach Puromycinselektion
YTS-NKp46- α PSCA-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression des CAR NKp46- α PSCA nach Puromycinselektion
YTS-NKp46-k- α PSCA-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression eines intrazellulär verkürzten CAR NKp46- α PSCA nach Puromycinselektion
YTS-HuBirA-Puro	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Puromycinselektion
YTS-HuBirA-Puro-NKp46-CDS-EGFP	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Puromycinselektion und Überexpression von NKp46 mit EGFP als Selektionsmarker
YTS-HuBirA-Puro-NKp46-KiBAP-EGFP	RPMI-1640 (komplett)	Diese Arbeit	stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA nach Puromycinselektion und von NKp46 mit den N-terminal angefügten Biotinakzeptorpeptiden Kimura-BAP und hPCoAC-BAP sowie EGFP als Selektionsmarker

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Der *E. coli* Stamm TOP10F' (2.1.3) wurde auf Luria-Bertani-(LB)-Agarplatten oder als Suspensionskultur in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden dabei im Erlenmeyerkolben bei 200 rpm geschüttelt. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 14 aufgeführt. Die Selektion ampicillin- beziehungsweise kanamycinresistenter Klone von *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Zusatzes von 100 µg/ml Ampicillin beziehungsweise von 50 µg/ml Kanamycin (Tabelle 2).

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode von Hanahan (1983) wurden kompetente Bakterien hergestellt. Dazu wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* TOP10F' in 2 ml 2x YT-Medium bei 37 °C und 180 rpm vorkultiviert. Nach 12 - 16 h wurde die Vorkultur 1:100 in 2x YT-Medium verdünnt. Es erfolgte eine Weiterkultivierung der Bakterien für circa 1,5 – 4 h bis zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, die bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 5 min auf 4 °C abgekühlt und zum Abzentrifugieren (3500 rpm, 5 min, 4 °C) auf zwei 50 ml-Greiner-Röhrchen verteilt. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in je 10 ml Transformationspuffer 1 (TFB1) aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte eine erneute Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Pellets wurden in je 2 ml Transformationspuffer 2 (TFB2) resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in Form von 50 µl

Aliquots bei -80 °C. Die Bestandteile der Transformationspuffer und des 2x YT-Mediums sind in Tabelle 11 und Tabelle 14 aufgelistet.

2.2.3 Transformation von Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von Plasmid-DNA durch prokaryontische, kompetente Zellen bezeichnet, die eine Amplifikation der Plasmid-DNA zum Ziel hat. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm TOP10F' besitzt eine hohe Transformationseffizienz.

Für die Transformation wurden 50 µl kompetenter Bakteriensuspension bei 4 °C aufgetaut und anschließend mit bis zu 1 µg DNA versetzt. In der darauf folgenden 15minütigen Inkubation bei 4 °C lagerte sich die Plasmid-DNA an die Bakterienzellwände an. Durch einen anschließenden Hitzeschock der Bakterien für 2 min bei 42 °C wurde die Plasmid-DNA von diesen aufgenommen. Darauf folgte eine Kultivierung der Bakterien in 950 µl LB-Medium ohne Antibiotika für 30 min bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer. Die Bakterien wurden anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen oder in LB-Flüssigmedium weiterkultiviert (Tabelle 14).

2.2.4 Blau-Weiß-Selektion

Mittels der Blau-Weiß-Selektion wurden *E. coli*-Klone identifiziert, die erfolgreich mit einem pCR2.1-Vektor samt Insert transformiert wurden.

Der pCR2.1-Vektor enthält den 5'-Abschnitt des lacZ-Gens, welcher für den N-terminalen Teil der β -Galaktosidase kodiert, wohingegen der im Rahmen dieser Arbeit genutzte *E. coli* Stamm TOP10F' Träger des 3'-Abschnitts ist und somit für den C-terminalen Teil kodiert. Die aus diesen beiden Untereinheiten bestehende β -Galaktosidase hat die Fähigkeit das farblose Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) in β -Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu spalten. Letzteres wird durch Luftsauerstoff oxidiert und dimerisiert schließlich zu einem blaugefärbten Indigoderivat, das die β -Galaktosidase bildenden Kolonien blau färbt.

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in den pCR2.1-Vektor erfolgte über eine im 5'-Abschnitt des lacZ-Gens gelegene multiple Klonierungsstelle. Durch Integration eines Inserts wird der Leserahmen für die N-terminale Untereinheit der β -Galaktosidase zerstört, so dass keine funktionelle β -Galaktosidase synthetisiert wird. Bakterien, die mit einem pCR2.1-Vektor samt Insert transformiert wurden, blieben somit weiß, wohingegen Bakterien, die den pCR2.1-Leervektor aufgenommen hatten, sich blau färbten.

Die hierfür genutzten ampicillinhaltigen LB-Agarplatten wurden mit 80 µg/ml des Laktose-Analogons X-Gal und 40 µg/ml des Induktors IPTG versetzt.

2.2.5 Plasmid-DNA-Präparation

2.2.5.1 Mini-DNA-Präparation

Zur Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab aus Bakterienkulturen wurde eine modifizierte Methode nach Holmes & Quigley (1981) genutzt, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Dazu wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Holzstäbchen von LB-Agarplatten gepickt und in Greiner-Röhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium überführt. Die Inkubation der Bakteriensuspension erfolgte über Nacht bei 37°C und 180 rpm. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in Eppendorf-Tubes überführt und pelletiert (7500 rpm, 1 min, RT). Das Pellet wurde in 350 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 25 µl Lysozym versetzt. Durch die sich anschließende zweiminütige Inkubation bei 95 °C und 500 rpm wurden die Zellwände aufgebrochen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (12000 rpm, 10 min, RT), bei der sich die DNA im wässrigen Überstand von den Zelltrümmern abtrennte. Nach der Entfernung des Zelltrümmerpellets mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens wurden 40 µl Natriumacetat zugegeben, die den pH-Wert der Lösung rapide absenkten. Dies führte zur schnellen Renaturierung der Plasmid-DNA, während die größere genomische DNA nur langsam renaturierte. Eine anschließende fünfminütige Inkubation mit 420 µl Isopropanol führte zur Ausfällung der bereits renaturierten Plasmid-DNA. Nach Abzentrifugation der Plasmid-DNA (12000 rpm, 10 min, 4°C) wurde diese mit 200 µl 70%igen Ethanol zur Entfernung von Salz- und Pufferresten gewaschen. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (12000 rpm, 2 min, 4°C), an den sich die Trocknung des Pellets bei 50 °C für 20 min im Thermomixer oder bei Raumtemperatur für 35 min anschloss. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl ddH₂O resuspendiert und mit 1 µl RNase A versetzt. Durch die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur wurden RNA-Verunreinigungen der Plasmid-DNA abgebaut und so die Reinheit der DNA-Lösung erhöht. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.5.2 Midi-DNA-Präparation

Für die Isolierung größerer und reinerer DNA-Mengen wurde das Invisorb Plasmid Midi Kit (Tabelle 10) nach Herstellerangaben genutzt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 600 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Die Aufspaltung der Zellen erfolgte wie bei der Mini-DNA-Präparation durch alkalischen Lyse. Die isolierte Midi-DNA ist durch die Nutzung von Anionen-Austauscher-Säulen jedoch sauberer als bei der Mini-DNA-Präparation.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen Arbeiten wurden im Rahmen der Gentechnikverordnung (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 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) wird zur Amplifikation eines ausgewählten DNA-Bereichs genutzt. Der PCR-Ansatz besteht neben der Ausgangs-DNA aus zwei spezifischen Primern (sense und antisense), sowie einer hitzestabilen DNA-Polymerase, geeigneten Pufferbedingungen und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs). Bei einer PCR ist ebenso der Einsatz mutagener Primer möglich, um eventuelle Restriktionsschnittstellen oder Translationsstart- bzw. Translationsstopp-Codons in die zu amplifizierende DNA einzuführen.

In dieser Arbeit wurde die DNA-Polymerase Phusion von Finnzymes (Tabelle 7) aufgrund ihrer geringen Fehlerrate durch ihre „proof reading“-Funktion für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungsarbeiten eingesetzt. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an das DNA-Template („Annealing“) wurde eine vereinfachte Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur T_m verwendet:

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

Formel 1: Berechnung der Primer-Schmelztemperatur

Der Standard-PCR-Ansatz und die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 23 und 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Standardreaktionsansatz mit der DNA-Polymerase Phusion

Komponente	Stammlösung	Volumen [μl]	Endkonzentration in 20 μl
Phusion HF Puffer	5x	4,0	1x
dNTP-Mix	10 mM pro dNTP	0,4	0,2 mM pro dNTP
Primer sense	10 pmol/ μl	1,0	0,5 pmol/ μl
Primer antisense	10 pmol/ μl	1,0	0,5 pmol/ μl
DNA-Template	variabel	variabel	50 ng
Phusion DNA-Polymerase	2 U/ μl	0,2	0,02 U/ μl
ddH ₂ O	-	ad 20,0	-

Tabelle 24: Übersicht über die PCR-Bedingung für die DNA-Polymerase Phusion. Es wurden bei der PCR 30 Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Synthese durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	10 sec
Hybridisierung	T _m + 3 °C	20 sec
Synthese	72 °C	1 kb / 15-30 sec
Terminale Synthese	72 °C	10 min
Reaktionsende	4 °C	∞

Alle PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (2.3.4) auf ihre richtige Größe überprüft. Diejenigen PCR-Produkte, die für weitere gentechnische Arbeiten verwendet wurden, wurden mittels des GeneJET PCR Purification Kits von Thermo Fisher Scientific aufgereinigt (2.1.8). Traten unerwünschten Nebenbanden auf, wurde das korrekte PCR-Produkt nach der Agarosegelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert (2.3.5).

2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und die Entfernung der Puffer nach einer Restriktionsendonukleasespaltung erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des GeneJET PCR Purification Kits von Thermo Fisher Scientific. Dabei wurde zur Elution statt des mitgelieferten Elutionspuffers ddH₂O verwendet.

2.3.3 Restriktionsendonukleasespaltung von DNA

Die Restriktionsendonukleasespaltung wurde in dieser Arbeit zum einen für präparative Zwecke, wie die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Vektoren, und zum anderen für analytische Zwecke, wie die Kontrolle von isolierten Plasmiden, genutzt. Die Inkubation der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (Thermo Fisher Scientific) erfolgte in dem für sie optimalen Puffer bei der optimalen Temperatur für eine Stunde. Bei einem gleichzeitigen Verdau mit zwei Enzymen wurde derjenige Puffer ausgewählt, bei dem beide Enzyme die größte Aktivität aufwiesen. Eventuelle Aktivitätsverluste wurden dabei durch Erhöhung der Enzymmenge ausgeglichen.

Die Restriktionsendonukleasespaltung wurde in einem 10 µl Standard-Restriktionsansatz (Tabelle 25) oder einem Vielfachen davon angesetzt.

Tabelle 25: Standard-Restriktionsansatz für die Restriktionsendonukleasespaltung von DNA

Komponente	Stammlösung	Volumen [μ l]	Endkonzentration in 10 μ l
Restriktionspuffer	10x	1,0	1x
Restriktionsenzym	10 U/ μ l	0,2 - 1,0	5 - 10 U
DNA-Template	variabel	variabel	0,1 - 2,5 μ g
ddH ₂ O	-	ad 10,0	-

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, mit deren Hilfe DNA-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße aufgetrennt und identifiziert werden können (Hames, 1981). In dieser Arbeit wurde eine Agarosegelelektrophorese mit einem waagerechten Gel bei 7 V / cm in 1x TAE-Puffer (Tabelle 11) zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und zur Entfernung von nicht benötigten Spaltprodukten nach einer Restriktionsendonukleasespaltung durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurde 1%ige Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Die Proben wurden vor der Gelelektrophorese mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6x) versetzt. Das Auftragen der Proben erfolgte nach kurzem Mischen. Anschließend wurde die Elektrophorese gestartet. Als Marker wurde die GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Agarosegele in einem Wasserbad mit 0,2 μ g/ml Ethidiumbromidlösung für 10 min inkubiert. Der Nachweis der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe erfolgte mittels eines UV-Trans-illuminators bei 312 nm.

2.3.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Am UV-Transilluminator bei 312 nm wurden die gewünschten DNA-Fragmente nach der Agarosegelelektrophorese (2.3.4) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die Gelelution der DNA mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kits der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben

Zur Bestimmung des Nukleinsäuregehalts von DNA- und RNA-Proben wurde die optische Dichte (OD) am Photometer (Synergy 2 Multi Plate Reader, Biotek) gemessen. Das Prinzip der Konzentrationsmessung beruht auf einer Anregung der nukleinsäurehaltigen Lösung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Mit Hilfe der so gewonnenen Werte ist sowohl die Berechnung der Konzentration als auch des Reinheitsgrades der Lösung mög-

lich. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Doppelstrang-DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Mittels des Quotienten OD_{260} zu OD_{280} kann eine Aussage über eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen getroffen werden. Bei reinen Nukleinsäurelösungen hat der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.7 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten

Um die Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurden die durch die Restriktionsendonukleasespaltung (2.3.3) entstandenen 5'-Enden mit Hilfe der FastAP thermosensitiven, alkalischen Phosphatase von Thermo Fisher Scientific dephosphoryliert. Dabei wurde die Plasmid-DNA (0,2 μg – 1 μg) mit zwei Units der FastAP und der entsprechenden Menge an 10x FastDigest-Puffer versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Hitzeinaktivierung der FastAP bei 75 °C für 15 Minuten abgebrochen.

2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des FastLink DNA Ligation Kits (Epicentre Biotechnologies). Um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen, wurden die einzusetzenden Vektor- und Insertmengen mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Formel 2: Berechnung der Vektor- und Insertmengen für den Ligationsansatz

Die Ligationsreaktion erfolgte in 20 μl -Ansätzen mit 2 U FastLink DNA-Ligase, 1x Ligationspuffer und 1 mM ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der FastLink DNA-Ligase bei 70 °C für 15 Minuten beendet.

Zur Ermittlung der Anzahl spontaner Religationen wurde immer ein Ansatz ohne Insert-DNA und nur mit dephosphorylierter Vektor-DNA bei der Transformation von kompetenten Bakterien (2.2.3) mitgeführt.

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung zur Überprüfung von Klonierungsprodukten wurde von der Firma SeqLab durchgeführt. Die zu sequenzierenden Proben wurden nach Angaben der Sequenzierfirma vorbereitet und verschickt. Der Vergleich der von SeqLab ermittelten Basenabfolge mit der erwarteten Basenabfolge erfolgte mittels des „Open-Source“-Programms ApE - A Plasmid Editor.

2.3.10 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen wurden 1×10^6 Zellen mittels Qiashredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben in RNase-freier Umgebung unter Einsatz von RNase AWAY-Lösung aus dem Zelllysat isoliert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sofern sie nicht unverzüglich für die cDNA-Synthese verwendet wurde.

2.3.11 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), wobei eine Reverse Transkriptase zum Einsatz kam. Der Ansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt und ist in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: Ansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Stammlösung	Volumen [μl]	Endkonzentration in $20\ \mu\text{l}$
RNA-Template	variabel	variabel	500 ng
Random Hexamer Primer	100 μM	1	5 μM
Reaktionspuffer	5x	4	1x
RiboLock RNase-Inhibitor	20 U/ μl	1	20 U
dNTP-Mix	10 mM	2	1 mM
RevertAid Reverse Transkriptase	200 U/ μl	1	200 U
ddH ₂ O	-	ad 20	-

Zu Kontrollzwecken wurden je ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, ein Ansatz ohne RNA-Template und eine im Kit mitgelieferte Positivkontrolle mit GAPDH-RNA und GAPDH-spezifischen Primern mitgeführt. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ im PCR-Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Lagerung der cDNA bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Um zu kontrollieren, ob der Ansatz nur die gewünschte cDNA enthielt oder nach der RNA-Präparation noch Reste der genomischen DNA vorlagen, wurde eine sogenannte MECL-PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Standard-PCR (2.3.1) mit spezifischen MECL-Primern (Tabelle 16). Lag ausschließlich cDNA als Template vor, wurde ein 300 bp langes Fragment amplifiziert, wohingegen bei einer Verunreinigung mit genomischer DNA ein 700 bp langes Fragment erzeugt wurde. Trat letzteres ein, wurde mittels des DNase I Kits von Qiagen ein DNase-Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt und aus der so gereinigten RNA erneut cDNA synthetisiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 ELISA

Der ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel Zytokine. Der Nachweis des Zytokins IFN- γ in dieser Arbeit erfolgte durch die Bindung der nachzuweisenden Substanz an spezifische Antikörper, sogenannte „capture antibodies“, die an den Boden einer 96-Wellplatte gebunden waren. Anschließend wurde ein zweiter spezifischer, biotinkoppelter Antikörper, ein „detection antibody“, hinzugegeben. Durch die Zugabe einer streptavidinkoppelten Meerrettichperoxidase, die an das Biotin des Antikörpers band, wurde das zugesetzte Substrat Luminol oxidiert. Dabei kam es zur Chemolumineszenz, die bei 450 nm im Photometer messbar war.

Die Sekretion des Zytokins IFN- γ in den Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des „Human IFN- γ ELISA Sets“ (BD) nachgewiesen.

Zur Bestimmung der IFN- γ -Ausschüttung aktivierter NK-Zellen wurden diese mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert (2.5.5.2). Als Negativkontrollen wurden Wildtyp-Ausgangszellen und eine Mediumkontrolle genutzt. Die IFN- γ -Bestimmung aus den Zellkulturüberständen wurde von Dr. Rebekka Wehner (TU Dresden, Institut für Immunologie) durchgeführt. Je drei unabhängige Messungen erfolgten im Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek). Zur Berechnung der IFN- γ -Konzentration wurde die Mediumkontrolle, die keine Zytokine enthielt, von den Messwerten subtrahiert und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Mittels des mitgeführten Standards von rekombinantem IFN- γ mit bekannter Konzentration wurde aus dessen Eichkurve die unbekannte Konzentration des IFN- γ im Medium mit Hilfe der oben berechneten Werte bestimmt.

2.4.2 Milde Lyse

Die milde Lyse von eukaryontischen Zellen wurde zur Gewinnung der Gesamtheit aller Proteine, des sogenannten Proteoms, genutzt, um diese für weiterführende Analysen zu verwenden.

Nach der Ernte der Zellen wurden diese zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C), mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 – 500 μ l eiskaltem RIPA-Lysepuffer (Tabelle 12) unter Zugabe der Proteaseinhibitoren Apoprotin und Leupetin (Tabelle 9) resuspendiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis, bei der die Proben mehrmals gevortext wurden. Die entstandenen Lysate wurden über Nacht bei -80 °C ein-

gefroren. Um die gelösten Proteine von unerwünschten Zelltrümmern zu trennen, wurden die Lysate auf Eis aufgetaut und zentrifugiert (12000 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die Überführung der proteinhaltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss in einem BCA-Assay (2.4.4) ermittelt.

2.4.3 Auftrennung von Membran- und zytoplasmatischen Proteinen

Zur Analyse, ob ein Protein in der Membran oder im Zytoplasma lokalisiert ist, wurde das ProteoJET Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas) verwendet. Mit dessen Hilfe wurden die eukaryontischen Zellen nach Herstellerangaben so lysiert, dass die Membranproteine von zytoplasmatischen Proteinen isoliert wurden. Das Prinzip beruht dabei auf der schrittweisen Lösung der Proteine mittels verschiedener milder, nicht-denaturierender Detergenzien. Den beiden Proteinfraktionen wurden die Proteaseinhibitoren Apoprotin und Leupetin (Tabelle 9) zugegeben. Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Membranfraktion mittels eines BCA-Assays (2.4.4). Die Proteinfraktionen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip des BCA-Assays (Smith *et al.*, 1985) beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren. Dabei ist die Menge der reduzierten Kupferionen proportional zur Proteinmenge. Die Cu^+ -Ionen bilden anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Absorptionsmaximum am Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm messbar ist.

Zunächst wurden 1:5- und 1:10-Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinproben (2.4.2 bzw. 2.4.3) mit RIPA-Lysepuffer bzw. „Membrane Protein Extraction“-Puffer hergestellt. Triplets von jeweils 25 µl der Verdünnungen wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch hergestellter BCA-Lösung wurden die Proben für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Farbumschlags am Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek). Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Eichkurve ermittelt, die mit Hilfe eines ebenfalls mitgeführten BSA-Standards erstellt wurde.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) genutzt. Zunächst werden die Cysteinbrücken der Proteine durch das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert und die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Kochen bei 95 °C aufgebrochen. Bei der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird die Eigenladung der Proteine durch SDS maskiert, so dass alle Proteine die gleiche negative Ladung aufweisen. Dadurch ist eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Kettenlänge möglich, die proportional zum Molekulargewicht ist, da längere Proteine stärker in der Gelmatrix zurückgehalten werden als kürzere.

Zu Beginn der Arbeiten wurde ein Polyacrylamidgel gegossen, das aus einem 12%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel bestand. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Gelelektrophorese

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

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden, luftblasenfreien Abschluss zu erhalten, und für 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das Isopropanol vollständig abgenommen und das Sammelgel über dem Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Probenkamm eingesetzt und das Gel für 30 min auspolymerisiert. Nach Entfernen des Probekamms wurden die Taschen mit 1x Laufpuffer (Tabelle 12) gespült. Bevor 50 μ g der Proteinproben pro Tasche aufgetragen wurden, erfolgte die Mischung der Proben mit 5x Laemmli-puffer im Verhältnis 5:1 und das anschließende Kochen für 10 min bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf). Außerdem wurde zusätzlich ein Proteingrößenstandard (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen, um das Molekulargewicht der Proteinproben bestimmen zu können. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer von Bio-Rad, die mit 1x Laufpuffer gefüllt war. Solange die Proteine sich im Sammelgel befanden, wurde eine

elektrische Spannung von 80 V verwendet. Sobald die Proteine ins Trenngel gelaufen waren, wurde die elektrische Spannung auf 120 V erhöht.

2.4.6 „Semidry“-Western Blot von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einem Semidry-Blotter (Bio-Rad) in einem elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran transferiert, wobei die negative Ladung der Proteine ausgenutzt wurde. Der Aufbau des Blots bestand aus jeweils einer Schicht mit Anodenpuffer I und II (Tabelle 12) getränkten Filterpapieren, der mittels Methanol aktivierten PVDF-Membran (Whatman), dem SDS-Polyacrylamidgel und einer Schicht mit Kathodenpuffer (Tabelle 12) getränkten Filterpapieren. Diese wurden luftblasenfrei übereinandergeschichtet und bei 25 V für 45 min geblottet.

2.4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Proteinnachweis erfolgte durch die Bindung von spezifischen Antikörpern. Zunächst wurde das zu untersuchende Protein durch einen Primärantikörper gebunden, der gegen Epitope des Zielproteins gerichtet war. Im Anschluss wurde ein Sekundärantikörper zugegeben, der speziesabhängig an den konstanten Bereich des Primärantikörpers band und mit dem Reporterenzym Meerrettichperoxidase („Horse Raddish Peroxidase“, HRP) gekoppelt war. Die HRP war in der Lage das Substrat Luminol in der Detektionslösung Luminata forte (Millipore) zu reduzieren, wobei es zu einer Chemolumineszenzfreisetzung kam, die im Bioimager LAS3000 (Fujifilm) bei unterschiedlichen Belichtungszeiten gemessen wurde. Die entstandenen Bilder wurden nachfolgend mit Adobe Photoshop CS5 aufbereitet und die detektierten Proteine densitometrisch durch Messung der relativen Pixeldichte mit dem Programm ImageJ (Tabelle 20) quantifiziert. Die detaillierte Beschreibung der einzelnen auf den „semidry“-Western Blot folgenden Arbeitsschritte ist in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28: Übersicht über die Arbeitsschritte beim immunologischen Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen. Außer die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in (Tabelle 12) zu finden.

Arbeitsschritt	Zeit
Inkubation mit Blockierungslösung	1 h
Inkubation mit dem Primärantikörper	1 h oder über Nacht
Waschen der Membran mit 1x TBS-TT	3 x 10 min
Waschen der Membran mit 1x TBS	5 min
Inkubation mit dem Sekundärantikörper	1 h
Waschen der Membran mit 1x TBS-TT	3 x 10 min
Waschen der Membran mit 1x TBS	5 min
Inkubation der Membran mit Detektionslösung	3 min
Detektion der Chemilumineszenz	30 sec - 15 min

Für eine weitere immunologische Untersuchung der PVDF-Membran wurden die gebundenen Antikörper durch das sogenannte „Stripping“ (2.4.8) entfernt.

2.4.8 „Stripping“ von PVDF-Membranen

Zum erneuten immunologischen Nachweis von Proteinen mit anderen Antikörpern auf schon untersuchten PVDF-Membranen ist es nötig, die an die Proteine gebundenen Antikörper abzulösen („to strip“, ablösen). Dazu wurden die PVDF-Membranen für eine Stunde in Strippingpuffer mit β -Mercaptoethanol (Tabelle 12) bei 55 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 10 min mit 1x TBS gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte entsprechen denen in Tabelle 28.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Air-Flow HERAsafe (Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 80 % Luftfeuchte. Für Suspensionszellen wurden dabei stehende und für adhärenzte Zelllinien liegende Zellkulturflaschen genutzt. Das Medium wurde mindestens aller drei Tage gewechselt.

Je nach Zelllinie oder Bedarf wurden die Zellen 1:5 bis 1:100 gesplittet, das heißt vereinzelt. Bei Suspensionszellen wurde dazu die gewünschte Anzahl an Zellen aller drei bis sieben Tage in frisches Medium eingesät. Adhärenzte Zellen wurden vereinzelt, wenn der Boden der Zellkulturflasche zu 80 - 100 % von einem konfluenten Zellrasen bewachsen

war. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und anschließend der Zellrasen vorsichtig mit PBS gespült. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurden sie für drei Minuten mit Trypsin-EDTA-Lösung (Tabelle 13) versetzt. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe vierfachen Menge an FKS-haltigem Medium. Von dieser Zellsuspension wurde die gewünschte Menge in eine neue Zellkulturflasche zurückgegeben und diese mit Medium aufgefüllt.

2.5.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnung der Zellsuspension mit 0,4%iger Trypanblaulösung hergestellt und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden alle vier Großquadrate ausgezählt, wobei Zellen, die das Trypanblau aufgenommen hatten, als tot angesehen und nicht mitgezählt wurden. Die Berechnung der Lebendzellzahl pro ml erfolgte nach unten stehender Formel. Die gewünschte Zellzahl wurde dann mit passendem Medium eingestellt.

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

Formel 3: Berechnung der 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.

Die Abnahme von circa 50 ml venösen Bluts erfolgte in handelsüblichen EDTA-Röhrchen. Anschließend wurde das EDTA-Blut 1:1 mit PBS verdünnt. Die peripheren mononukleären Blutzellen („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMC) wurden im nächsten Schritt über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dazu wurden 20 ml Ficoll-Lösung in 50 ml Greiner-Röhrchen vorgelegt und diese vorsichtig mit 30 ml des verdünnten Bluts überschichtet. Die Auftrennung des Bluts aufgrund der unterschiedlichen Dichte seiner Bestandteile erfolgte in dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 25 min, RT, ohne Bremse). Dabei sanken die schweren Erythrozyten zu Boden, wohingegen sich die PBMC zwischen der sich darüber befindlichen Ficoll-Lösung und dem Serum ansammelten. Sie wurden mit Hilfe einer Serumpipette abgenommen und im Anschluss

dreimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C). Die PBMC wurden in 2 ml PBS aufgenommen und deren Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt (2.5.1.1). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min, 4°C) erfolgte die Isolation der primären NK-Zellen mit Hilfe des NK Cell Isolation Kits (Miltenyi) nach Herstellerangaben. Das Prinzip des Kits beruhte auf der Bindung biotinkoppelter Antikörper an alle Zellen aus der Gruppe der PBMC außer den NK-Zellen. An diese Antikörper banden wiederum anti-Biotin-Antikörper mit magnetischen Microbeads, die im magnetischen Feld eines MACS Separators (Miltenyi) in einer MACS-Säule (LS Column, Miltenyi) zurückgehalten wurden. Die NK-Zellen flossen ungehindert durch die Säule und wurden aufgefangen. Die so isolierten NK-Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Jeweils 1×10^6 NK-Zellen wurden in einem Well einer 24-Well-Platte mit 1 ml CellGro-Medium (Tabelle 15) eingesät. Die Aktivierung der frisch isolierten, ruhenden, primären NK-Zellen sowie die Anregung ihrer Proliferation erfolgte mittels des NK Cell Activation / Expansion Kits (Miltenyi), das nach Herstellerangaben verwendet wurde.

2.5.1.3 Überprüfung der Proliferation expandierender NK-Zellen mittels CFSE-Färbung

Der grün fluoreszierende Lebendfarbstoff CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester) lagert sich im Zytosol von Zellen ein, so dass er bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Somit ist anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität die Zellproliferation nachweisbar.

Im Anschluss an die Isolation der NK-Zellen aus dem peripheren Blut wurden bis zu 1×10^7 primäre NK-Zellen in 1 ml PBS + 0,1 % BSA aufgenommen und in einem Greiner-Röhrchen mit 1 µl 1 mM in DMSO gelöstem CFSE versetzt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 10 min bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde mit 10 ml CellGro komplett die Färbung abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 3 min). Nach dem nochmaligen Waschen der Zellen wurden diese in 1 ml CellGro komplett in einer 24-Wellplatte weiterkultiviert. Die Fluoreszenzintensität wurde bis zu 6 Tage lang aller 24 Stunden von 2×10^5 Zellen mittels Durchflusszytometrie (2.5.4) bestimmt.

2.5.1.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zelllinien

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte zur langfristigen Aufbewahrung von Zelllinien. Dazu wurden mindestens 1×10^6 Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min), einmal mit PBS gewaschen und in Kryoröhrchen mit Kryokonservierungsmedium resuspendiert. Um einer Eiskristallbildung vorzubeugen, wurden die Zellen bei -80 °C sehr langsam (circa 1 K/min)

in einem Kryokonservierungsgefäß mit Isopropanol eingefroren. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Kryokonserven in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Rekultivierung solcher Kryokonserven wurde durch Erwärmen der Kryoröhrchen unter fließend warmem Wasser durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in ein Greiner-Röhrchen mit 5 ml Medium überführt und abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Nach 24-stündiger Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel.

2.5.2 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin zur Generierung lentiviraler Partikel

Unter dem Begriff transiente Transfektion wird das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryontische Wirtszelle verstanden. In dieser Arbeit wurden HEK293T-Zellen mit Hilfe des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) transient transfiziert. PEI besitzt positiv geladene Aminogruppen, an die die einzubringende DNA bindet und kondensiert. Der gebildete PEI-DNA-Komplex interagiert mit der Zellmembran und wird über Endozytose von der Zelle aufgenommen. In der Zelle kommt es anschließend aufgrund des sogenannten „Proton-Sponge“-Effekts zur DNA-Freisetzung aus den Endosomen (Boussif *et al.*, 1995).

Die transiente Transfektion wurde in dieser Arbeit zur Generierung lentiviraler Partikel unter Verwendung des Drei-Vektor-Systems nach Soneoka *et al.* (1995) eingesetzt. Hierfür wurde das gewünschte Transgen in die lentiviralen Vektoren pHATrick oder p6NST50 eingebracht, die das modifizierte virale Genom mit dem Verpackungssignal ψ und den LTR („Long Terminal Repeat“-)Sequenzen enthalten. Ersteres ermöglicht die korrekte Verpackung der viralen mRNA in das Nukleokapsid des Viruspartikels. Die LTR-Sequenzen sind hingegen für die reverse Transkription und die stabile Integration in das Genom der transduzierten Zellen verantwortlich. Zur Herstellung der replikationsinkompetenten Viruspartikel wurden zusätzlich zwei Hilfsvektoren benötigt. Zum einen der Vektor pcz-VSV-G, der für das Hüllprotein G des „*Vesicular stomatitis Virus*“ (VSV-G) kodiert und zum anderen der Vektor pCD/NL-BH, der die Gene für Matrix- und Kapsidproteine sowie virale Enzyme enthält. Außerdem enthalten sowohl die Hilfsvektoren als auch die Vektoren pHATrick und p6NST50 den Promotor des *Cytomegalievirus* (CMV), dessen Aktivität durch die Gabe von Natriumbutyrat gesteigert wird, wodurch eine verstärkte Expression der Virusproteine und -enzyme erfolgt.

Am Tag vor der transienten Transfektion wurden 4×10^6 HEK293T-Zellen als Verpackungszellen in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm mit 6 ml DMEM-Komplettmedium eingesät. Nach Kultivierung der Zellen für 24 h unter Standardbedingun-

gen erfolgte die PEI-Transfektion. Dazu wurde zunächst die PEI-Lösung, pro Zellkulturschale bestehend aus 45 µl PEI-Stammlösung (1 mg/ml) und 955 µl DMEM ohne Zusätze, angesetzt. Anschließend erfolgte die Herstellung der DNA-Lösung aus jeweils 5 µg DNA der drei benötigten Plasmide, die in 1 ml mit DMEM ohne Zusätze aufgenommen wurden. Nach fünfminütiger Inkubation der beiden Lösungen bei Raumtemperatur wurden diese miteinander gemischt und weitere 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium der HEK293T-Zellen gegen 4 ml DMEM-Komplettmedium mit 15 % FKS ausgetauscht und die 2 ml PEI-DNA-Mix vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde zur Induktion des CMV-Promotors Natriumbutyrat-Lösung mit einer Endkonzentration von 10 mM für 8 h zum Medium der Verpackungszellen gegeben. Der anschließende Mediumwechsel erfolgte mit 4,5 ml DMEM-Komplettmedium. Nach Kultivierung der Zellen über Nacht im Brutschrank wurde der Zellkulturüberstand, der die lentiviralen Viruspartikel enthielt, mittels einer Spritze abgesaugt und über einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm sterilfiltriert. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde entweder sofort zur Transduktion genutzt oder zur späteren Verwendung bei -80 °C weggefroren.

2.5.3 Stabile Transduktion

Bei der stabilen Transduktion wird ein Gen mittels viraler Partikel in eine Wirtszelle eingebracht und in dessen Genom integriert, so dass eine dauerhafte Genexpression gewährleistet ist.

2.5.3.1 Transduktion von Zelllinien

Zur Transduktion von Zelllinien wurden zunächst 3×10^5 Zielzellen in eine 6-Wellplatte in 2 ml Komplettmedium eingesät und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 2 ml des wie in 2.5.2 hergestellten, virushaltigen Zellkulturüberstands und 8 µg/ml Polybren, das die Virusaufnahme begünstigt, inkubiert. Die Transduktion wurde ein- bis zweimal wiederholt, bevor die Zielzellen wieder in Komplettmedium überführt wurden.

Zum Erhalt einer homogenen Zellpopulation und zur Eliminierung nicht transduzierter Zellen wurde, falls möglich, eine Antibiotikaselektion durchgeführt. Das entsprechende Resistenzgen wurde neben dem rekombinanten Gen durch die lentiviralen Partikel eingebracht. Die in der Arbeit verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.5.3.2 Transduktion von primären humanen NK-Zellen

Die Transduktion von primären humanen NK-Zellen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Sutlu (Sutlu *et al.*, 2012) Dazu wurden $1,5 \times 10^6$ primäre NK-Zellen zwei Tage nach ihrer Isolation (2.5.1.2) in einem Well einer 48-Wellplatte mit 0,5 ml virushaltige Zellkulturüberstand (2.5.2) versetzt. Diesem wurde neben 8 µg/ml Polybren, das die Virusaufnahme begünstigt, noch 1000 IU/ml Proleukin S, 20 ng/ml IL-21 und 2,5 µM BX795 zugesetzt. Dabei dienen die Zytokine Proleukin S (Novartis, gentechnisch erzeugtes IL-2 aus *E. coli*) und IL-21 der Proliferation und Expansion der NK-Zellen während der Transduktion, wohingegen BX795 ein TBK1 / IKKε-Inhibitor ist, der die natürliche Resistenz der NK-Zellen gegenüber virale Infektionen hemmt. Vor der Inkubation der NK-Zellen für 6 h im Brutschrank bei 37 °C wurden diese einer sogenannten Spintransduktion unterzogen, wobei die mit den lentiviralen Partikel versetzen NK-Zellen für 1 h mit 1800 rpm bei 37 °C zentrifugiert wurden. Nach der Inkubation wurden die lentiviralen Partikel entfernt, die NK-Zellen in 1 ml CellGro-Medium (komplett) aufgenommen und unter Standardbedingungen über Nacht kultiviert. Die Transduktion der primären NK-Zellen wurde zweimal wiederholt. Die Selektion der NK-Zellen für 6 h mit 10 µg/ml Puromycin erfolgte 3 bis 7 Tage nach der letzten Transduktion.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem die Zellen einer Suspension in einem kontinuierlichen, laminaren Hüllstrom fokussiert und einzeln von einem Laserstrahl erfasst werden. Die dabei entstehende Streuung des Lichts wird über optische Detektionssysteme registriert und gibt Auskunft über die intrazelluläre Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und die Größe der Zelle (Vorwärtsstreulicht, FSC). Des Weiteren ist die Emissionsmessung angeregter Fluoreszenzfarbstoffe möglich. In dieser Arbeit wurden das Durchflusszytometer MACS Quant (Miltenyi) und die Analysesoftware FlowJo Version 10 (Tree Star) verwendet.

Zum Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche, wie zum Beispiel den transgenen Rezeptoren, wurden spezifische Antikörper eingesetzt. Diese waren entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt oder der antigenspezifische Primärantikörper wurde von einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gebunden. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Die Markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern erfolgte auf Eis. Dazu wurden 4×10^5 Zellen zunächst abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und mit 300 µl PBS gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper je nach Herstellerangaben im entspre-

chenden Verhältnis für 10 min oder 1 h mit den Zellen inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 300 µl PBS, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden bei der Verwendung von direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern die Zellen im Anschluss gemessen. Bei ungekoppelten Primärantikörpern erfolgte in einem weiteren Schritt die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers. Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen je nach Herstellerangaben für 10 bis 30 min mit dem Sekundärantikörper versetzt. Nach erneutem Waschen der Zellen mit 300 µl PBS wurden diese im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die entweder mit der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Isotypkontrolle oder nur dem Sekundärantikörper markiert wurden.

2.5.5 Überprüfung des zytotoxischen Potentials *in vitro*

2.5.5.1 Chrom-Freisetzungssassay

Der Chrom-Freisetzungssassay wurde genutzt, um die spezifische Zytotoxizität von modifizierten Effektorzellen (YTS oder primäre humane NK-Zellen) gegen verschiedene Tumorzelllinien zu untersuchen. Dazu wurden die Zielzellen mit radioaktiven Natriumchromat (^{51}Cr) inkubiert, das sich in diesen, umgeben von einer Hydrathülle, einlagert. Wurden Zielzellen durch die zytotoxischen Mechanismen der mit ihnen kokultivierten Effektorzellen abgetötet, kam es zur Freisetzung von radioaktivem Chrom. Die Menge des in den Zellkulturüberstand freigesetzten Chroms ist dabei ein Maß für die Anzahl getöteter Zielzellen und damit indirekt ein Maß für die Zytotoxizität der Effektorzellen.

Zur Beladung der Zielzellen mit ^{51}Cr wurden 2×10^6 Zellen abzentrifugiert und in 1 ml RPMI-1640-Komplettmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in ein Well einer 24-Wellzellkulturplatte überführt und mit circa 1,5 MBq ^{51}Cr für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Bei den Versuchen zur Blockierung der Antigen-CAR-Erkennung wurden zusätzlich 15 µl des Antikörpers anti-PSCA zur Abdeckung des PSCA-Antigens auf der Oberfläche der Zielzellen zugesetzt. Um überschüssiges Chrom zu entfernen, wurden die Zielzellen dreimal mit 7 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml RPMI-1640-Komplettmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zielzellen auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Die auf die gleiche Konzentration eingestellten YTS Effektorzellen wurden in einem Target-Effektorzell-Verhältnis von 1:10, 1:5 und 1:2,5 in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI-1640-Komplettmedium in einer 96-Well-Rundbodenplatte mit den Zielzellen für 6 h bzw. 22 h bei 37 °C im Brutschrank kokultiviert. Neben YTS NK-Zellen wurden auch primäre humane NK-Zellen als Effektorzellen eingesetzt. Bei diesen Zellen wurde für den Chrom-Freisetzungssassay statt RPMI-1640-Komplettmedium CellGro SCGM ohne Zusätze verwendet, wobei die NK-Zellen bereits 48 h vor Versuchsbeginn in diesem Medium kultiviert wurden. Des Weiteren

wurde ein Target-Effektorzell-Verhältnis von 1:30, 1:15 und 1:7,5 gewählt und die NK-Zellen für nur 4 h kokultiviert. Für jeden Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Um die minimale Chromfreisetzung zu ermitteln, wurde ein Ansatz mit Zielzellen jedoch ohne Effektorzellen mitgeführt. Zur Feststellung der maximalen Chromfreisetzung erfolgte die Lyse der Zielzellen in Medium mit 5 % Triton X-100. Nach Ende der Kokultivierungszeit wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert (1200 rpm, 3 min, Raumtemperatur) und 25 µl des Zellkulturüberstands in eine 96-Well-Szintillationsplatte, in der bereits 150 µl Szintillationsflüssigkeit vorgelegt worden waren, überführt. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und für 5 min geschüttelt. Im Anschluss wurde die in den Zellkulturüberstand freigesetzte Radioaktivität am MicroBeta 1450 Trilux Beta-Counters (Perkin Elmer) bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Lyse der Zielzellen erfolgte nach der Formel:

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

Formel 4: Berechnung der spezifischen Lyse

2.5.5.2 IFN- γ -Sekretion

Die Erkennung von Antigenen auf der Tumorzelloberfläche bewirkt die Freisetzung zytotoxischer Zytokine, wie IFN- γ , durch aktivierte NK-Zellen. Zur Bestimmung der IFN- γ -Ausschüttung wurden die NK-Zellen mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert. Dazu wurden 2×10^4 Zielzellen und 1×10^5 YTS NK-Zellen (Target-Effektorzell-Verhältnis 1:5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI-1640-Komplettmedium in eine 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert und für 6 h unter Standardbedingungen kultiviert. Neben YTS NK-Zellen wurden auch primäre humane NK-Zellen genutzt. Diese wurden 48 h vor Versuchsbeginn in CellGro SCGM ohne Zusätze kultiviert. Dieses Medium wurde auch zur Kokultivierung mit den Zielzellen genutzt, wobei ein Ansatz aus $1,5 \times 10^4$ Zielzellen und $7,5 \times 10^4$ NK-Zellen bestand. Als Kontrolle diente sowohl für YTS als auch primäre humane NK-Zellen ein Ansatz nur mit Effektorzellen. Nach Abschluss der Kokultivierung wurden 100 µl Zellkulturüberstand abgenommen und bis zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration bei -20 °C weggefroren. Die Konzentration des Zytokins IFN- γ im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des Human IFN- γ ELISA Sets (BD), wie unter 2.4.1 beschrieben, nachgewiesen.

2.5.5.3 Nachweis von CD107a als Marker der NK-Zellaktivität

CD107a ist ein stark glykosyliertes Membranprotein, das in der Membran zytosolischer Granula vorkommt. Die Expression von CD107a auf der Zelloberfläche von NK-Zellen

nach der Degranulation korreliert dabei mit der Zytokinsekretion und der NK-Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen. Somit ist die CD107a-Expression ein Marker für die NK-Zellaktivität nach der Stimulation mit Zielzellen (Alter, Malenfant & Altfeld, 2004).

In diesem Versuch wurden 3×10^5 YTS NK-Zellen mit der gleichen Anzahl von Zielzellen in 200 μ l RPMI-1640-Komplettmedium in einer 96-Well-Rundbodenplatte unter Zugabe von 10 μ l anti-CD107a-PE (Miltenyi) für 1 h kokultiviert. Anschließend wurden 2 mM Monensin hinzugegeben und die Kokultivierung für weitere 3 h fortgesetzt. Das Ionophor Monensin zerstört dabei die Golgi-Apparatstruktur und verhindert so den vesikulären Transport in eukaryontischen Zellen, so dass sich durch die inhibierte Degranulation CD107a an der Zelloberfläche ansammelt (Fliesler & Basinger, 1987). Nach Ende der Kokultivierung wurden die Proben mit anti-CD56-APC (Miltenyi) nach Herstellerangaben gefärbt, um bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse (2.5.4) die YTS NK-Zellen von den Zielzellen zu unterscheiden. Als Kontrolle für die unspezifische Färbung der Zellen wurden Ansätze mit den entsprechenden Isotypkontrollen mitgeführt. Mittels der Durchflusszytometrie wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des CD107a-Signals ermittelt. Dabei wurde die basale Degranulation, die dem Ansatz YTS NK-Zellen ohne Zielzellen entspricht, gleich eins und die MFI der Ansätze mit den Zielzellen im Verhältnis dazu gesetzt.

2.5.6 Biotinylierung von eukaryontischen Zellen

Bei der enzymatischen Biotinylierung wird Biotin mit Hilfe einer Biotinproteinligase unter ATP-Verbrauch kovalent an einen spezifischen Lysinrest eines Biotinakzeptorpeptids gebunden. Der in dieser Arbeit generierte NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP enthält die beiden Biotinakzeptorpeptide (BAP) Kimura-BAP und humanes Propionyl-CoenzymA-Carboxylase-BAP (hPCoAC-BAP), die entweder exogen oder endogen biotinyliert wurden.

2.5.6.1 Biotinylierung mittels exogener BirA

Mit Hilfe der exogenen Biotinproteinligase BirA von Avidity erfolgte die Biotinylierung der Biotinakzeptorpeptide Kimura-BAP und hPCoAC-BAP im modifizierten NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP in Anwesenheit von ATP.

Für die exogene Biotinylierung von HEK293T wurden 3×10^5 HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen in ein Well einer 6-Wellplatte in 2 ml DMEM-Komplettmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 800 μ l frischen DMEM-Komplettmedium versetzt. Des Weiteren wurden 100 μ l ATP-haltiger Puffer A und 100 μ l Biotin-haltiger Puffer B sowie 2,5 μ g bzw. 5 μ g exogene Biotinproteinligase, die 12500 U bzw. 25000 U Enzym entsprach, für 1 h, 2 h und 22 h zugegeben.

Außerdem wurde die Haltbarkeit der Biotinylierung nach einstündiger Inkubation mit 2,5 µg der exogenen BirA ermittelt. Dazu wurden HEK293T nach Inkubation mit exogenen BirA mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml frischem DMEM-Komplettmedium versetzt. Über einen Zeitraum von 7 h erfolgte die Analyse der biotinylierten Zellen. Als Kontrolle bei allen Versuchen wurden HEK293T-NKp46-CDS-Puro-Zellen mitgeführt. Die Biotinylierung der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (2.5.4) unter Verwendung des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) ermittelt.

Vor jedem Versuch mit den YTS NK-Zellen wurden diese für 24 h in frischem RPMI-1640-Komplettmedium inkubiert. Um den Einfluss des Mediums auf die exogene Biotinylierung in YTS NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in den vier verschiedenen Komplettmedien DMEM, RPMI-1640, BME und α -MEM mit 50 µM Biotin über einen Zeitraum von 0 h bis 2 h und für 22 h inkubiert. Pro Ansatz wurden dazu jeweils 4×10^5 YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen in ein Well einer 48-Wellplatte in 800 µl des entsprechenden Mediums eingesät. Zusätzlich wurden jeweils 100 µl Puffer A und B sowie 2,5 µg BirA, das entsprach 12500 U Enzym, zugegeben. Puffer A enthielt das für die Biotinylierungsreaktion notwendige ATP und Puffer B das Biotin. Des Weiteren wurde die Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung untersucht. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, in RPMI-1640-Komplettmedium mit der exogenen BirA und den beiden Puffern für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit 5 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die YTS NK-Zellen in 1 ml frischem RPMI-1640-Komplettmedium ohne exogene BirA in eine neue 48-Wellplatte eingesät. Über einen Zeitraum von 7 h wurde jede Stunde der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen ermittelt. Als Kontrolle dienten bei allen Versuchen YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS-Puro-Zellen. Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch (2.5.4) mit Hilfe des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) analysiert.

2.5.6.2 Biotinylierung mittels endogener BirA

Durch die stabile Expression der humanisierten Biotinproteinligase HuBirA in HEK293T bzw. YTS NK-Zellen war es möglich, dass Biotin aus dem Zellkulturmedium bzw. zugesetztes Biotin durch diese Zelllinien an die Biotinakzeptorpeptide Kimura-BAP und hPCoAC-BAP im modifizierten NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP gebunden wurde.

Zum Nachweis der endogenen Biotinylierung in HEK293T wurden in zwei Wells einer 6-Wellplatte jeweils 3×10^5 HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen ausgesät und für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten HEK293T-HuBirA-NKp46-CDS-Puro-Zellen und als Positivkontrolle HEK293T-HuBirA-DAP12-CD94-NKG2C-KiBAP-Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml frischem DMEM-Komplettmedium versetzt, wobei einem der beiden Wells zusätzlich 50 µM Biotinlösung zugesetzt wurde. Nach der Kultivie-

nung für weitere 24 h unter Standardbedingungen wurden die Zellen durchflusszytometrisch (2.5.4) mittels des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) analysiert.

Vor jedem Versuch mit den YTS NK-Zellen wurden diese für 24 h in frischem RPMI-1640-Komplettmedium inkubiert. Die Untersuchung der endogenen Biotinylierung in YTS NK-Zellen erfolgte in den beiden Komplettmedien DMEM und RPMI-1640 über einen Zeitraum von 0 h bis 5 h und 22 h. Den Komplettmedien wurde entweder selbsthergestellte Biotinlösung von Sigma oder gekaufte Biotinlösung von Avidity in den Konzentrationen 50 μM und 100 μM zugegeben. Als Kontrolle wurde Medium ohne Biotinzugabe mitgeführt. Pro Ansatz wurden jeweils 2×10^5 YTS-HuBirA-Puro-NKp46-KiBAP-EGFP-Zellen in ein Well einer 12-Wellplatte in 1 ml des entsprechenden Mediums eingesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Als Kontrolle dienten YTS-HuBirA-Puro-NKp46-CDS-EGFP-Zellen. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (2.5.4) unter Nutzung des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi).

2.5.6.3 Bindung des Einzelkettenantikörpers $\alpha\text{PSCA-BAP}$ an PSCA und NKp46-KiBAP

Nach der exogenen oder endogenen Biotinylierung des NK-Zellrezeptors NKp46-KiBAP wurde im nächsten Schritt die Bindung des biotinylierten Einzelkettenantikörpers gegen PSCA ($\alpha\text{PSCA-BAP}$, 2.1.2) an den biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptor untersucht.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Spezifität des biotinylierten Einzelkettenantikörpers $\alpha\text{PSCA-BAP}$ gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen durch dessen Bindung an das PSCA auf deren Zelloberfläche. Dazu wurden 4×10^5 HEK293T-PSCA-Zellen für 1 h mit 2 μg $\alpha\text{PSCA-BAP}$ auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4), wobei $\alpha\text{PSCA-BAP}$ über sein myc-Epitop mittels des Antikörpers anti-c-myc-FITC (Miltenyi) detektiert wurde. Parallel dazu wurde der Biotinylierungsgrad von $\alpha\text{PSCA-BAP}$ mittels des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) ermittelt.

Zur Bindung des biotinylierten Einzelkettenantikörpers $\alpha\text{PSCA-BAP}$ an den biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptor wurde das biotinylierte $\alpha\text{PSCA-BAP}$ zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Neutravidin im molekularen Verhältnis von 1:1 inkubiert. Dabei wurden Ansätze mit Proteinmengen von 1 μg , 2,5 μg , 5 μg und 10 μg biotinyliertem $\alpha\text{PSCA-BAP}$ verwendet. Parallel dazu wurden 1×10^6 biotinylierte YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen mit den verschiedenen Ansätzen von $\alpha\text{PSCA-BAP-Neutravidin}$ in einem Gesamtvolumen von 100 μl für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden YTS-HuBirA-NKp46-CDS-Zellen mitgeführt. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) mittels der Antikörper anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-APC von Miltenyi zur Oberflächendetektion des

über Neutravidin gebundenen α PSCA-BAP an den biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptor. Dabei wurde das myc-Epitop von α PSCA-BAP zu dessen Detektion genutzt.

Die Bindung von α PSCA-BAP an die zuvor exogen für 2 h biotinylierten YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen erfolgte nach dem Schema, das bereits bei den endogen biotinylierten YTS NK-Zellen beschrieben wurde. Als Negativkontrolle dienten YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS-Puro-Zellen. Da CD3- ζ ebenfalls über ein myc-Epitop verfügt, wurde bei der durchflusszytometrischen Analyse der Antikörper anti-His-PE von Miltenyi eingesetzt. Mit dessen Hilfe wurde α PSCA-BAP über sein His-Epitop detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Der chimäre Antigenrezeptor NKp46- α PSCA

Das Prostatastammzellantigen (PSCA) wird stark auf der Oberfläche von verschiedenen Tumoren, wie Prostatakarzinomen und Glioblastomen, exprimiert. Laut Studien stellt es damit ein vielversprechendes Antigen für die adjuvante Immuntherapie dar. Durch die Verknüpfung eines Einzelkettenantikörpers gegen PSCA mit dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 wurde der chimäre Antigenrezeptor (CAR) NKp46- α PSCA generiert. Die mit diesem CAR-arnierten YTS und primären humanen NK-Zellen wurden auf ihr zytotoxisches Potenzial gegen PSCA-exprimierende Tumorzellen untersucht.

3.1.1 Generierung des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA

Der chimäre Antigenrezeptor NKp46- α PSCA besteht aus dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46 und dem etablierten PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörper α PSCA (Morgenroth *et al.*, 2007). Bei der Klonierung wurden die beiden lentiviralen Expressionsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und pHATrick- α PSCA-DAP12-EGFP (Tabelle 18) von Dr. Katrin Töpfer (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) als Ausgangsvektoren genutzt. Dabei handelt es sich um modifizierte p6NST1-Vektoren, die für das Fusionsprotein α PSCA-DAP12/T2A/Puro^R beziehungsweise α PSCA-DAP12/T2A/EGFP kodieren. Die T2A-Schnittstelle, ein 2A-Peptidkonsensusmotiv des *Thosea asigna Virus*, ermöglicht dabei die proteolytische Spaltung des CAR α PSCA-DAP12 von dem Selektionsmarker Puro^R beziehungsweise dem Reporterprotein EGFP. Die Regulation der CAR-Expression erfolgt über einen sich in 5'-Richtung befindlichen U3-Promotor des „Spleen Focus Forming Virus“ (pSFFV U3). Vor dem offenen CAR-Leserahmen wurde eine KOZAK-Sequenz eingefügt, die als eukaryontische Ribosomenbindungsstelle eine verbesserte CAR-Expression gewährleistet (Kozak, 1991). An die KOZAK-Sequenz schließt sich der erste Bestandteil des CAR-Leserahmens, das murine Igk-Signalpeptid, an. Es dient dem Zugang des CAR zum sekretorischen Signalweg.

Zur Generierung des CAR NKp46- α PSCA wurde zunächst das Signaladapterprotein DAP12 mittels der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *NotI* aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und pHATrick- α PSCA-DAP12-EGFP entfernt. Parallel dazu wurde NKp46 aus dem Vektor pUC57-NKp46-KiBAP, generiert von Eurofins MWG Operon, mittels der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *EagI* gewonnen. Dabei wurden

mittels *SphI*-Verdau zudem das Signalpeptid und die sechs nachfolgenden Aminosäuren sowie die sich anschließenden Biotinakzeptorpeptide (BAP) Kimura-BAP und hPCoAC-BAP von NKp46 abgespalten. Durch den Restriktionsverdau mit *EagI* wurde außerdem das Stoppcodon von NKp46 deletiert. Da die Restriktionsendonukleaseschnittstelle *NotI* kompatibel zu *EagI* ist, wurde NKp46 in die linearisierten Ausgangsvektoren eingefügt. Die entstandenen Vektoren pHATrick-NKp46- α PSCA-Puro^R beziehungsweise pHATrick-NKp46- α PSCA-EGFP enthalten den CAR NKp46- α PSCA, der über die T2A-Schnittstelle von seinem Selektionsmarker Puro^R beziehungsweise dem Reporterprotein EGFP abgespalten wird (Abbildung 3). Die detaillierten Vektorkarten und Sequenzen zu dieser Klonierung befinden sich im Anhang.

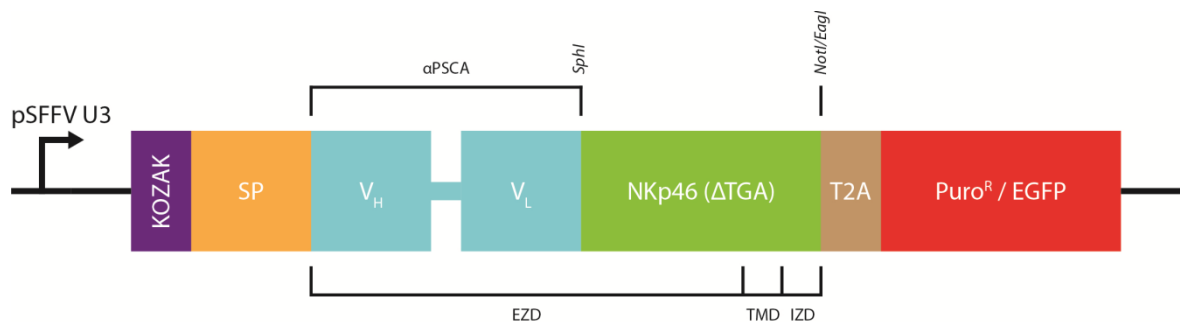


Abbildung 3: Schematische Darstellung des CAR-Konstrukts NKp46- α PSCA. Der offene CAR-Leserahmen kodiert für das Fusionsprotein NKp46- α PSCA/T2A/Puro^R beziehungsweise NKp46- α PSCA/T2A/EGFP. Die CAR-Expression wird durch den Promotor pSFFV U3 reguliert. Der anschließende Eintritt des CAR in den sekretorischen Weg wird durch das Igk-Signalpeptid vermittelt.

(pSFFV U3: U3-Promotor des „Spleen Focus Forming Virus“; SP: murines Igk-Signalpeptid; V_H: schwere Kette des Einzelkettenantikörpers; V_L: leichte Kette des Einzelkettenantikörpers; NKp46 (Δ TGA): NK-Zellrezeptor NKp46 mit deletiertem Stoppcodon; T2A: proteolytische Spaltstelle des *Thosea asigna Virus*; Puro^R: Puromycinresistenz; EGFP: „Enhanced Green Fluorescent Protein“; EKD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrandomäne; IZD: intrazelluläre Domäne)

3.1.2 Generierung der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46- α PSCA-k

Zur Generierung der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46- α PSCA-k wurden die bereits unter 3.1.1 beschriebenen lentiviralen Expressionsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und pHATrick- α PSCA-DAP12-EGFP (Tabelle 18) von Dr. Katrin Töpfer (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) als Ausgangsvektoren verwendet.

Bei der Klonierung von NKp46-CDS wurde zunächst der CAR α PSCA-DAP12 mit der vorangestellten KOZAK-Sequenz und dem murinen Igk-Signalpeptid mittels der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI* aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-

Puro^R und -EGFP entfernt. NKp46 wurde parallel dazu mit seinem eigenen Signalpeptid und einer vorangestellten KOZAK-Sequenz mittels *AgeI* und *EagI* aus dem Vektor pCR2.1-NKp46-CDS, generiert von Eurofins MWG Operon, ausgeschnitten. Aufgrund der Kompatibilität der Restriktionsnukleaseschnittstelle *EagI* mit *NotI* entstanden die Vektoren pHATrick-NKp46-CDS-Puro^R beziehungsweise pHATrick-NKp46-CDS-EGFP. Da NK-Zellen *per se* NKp46 exprimieren, sollte mit Hilfe dieser Kontrolle gezeigt werden, dass die Überexpression der Wildtypform von NKp46 keine NK-Zellaktivierung induziert. Die schematische Klonierung ist in Abbildung 4 dargestellt. Die zugehörigen Vektorkarten und Sequenzen befinden sich im Anhang.

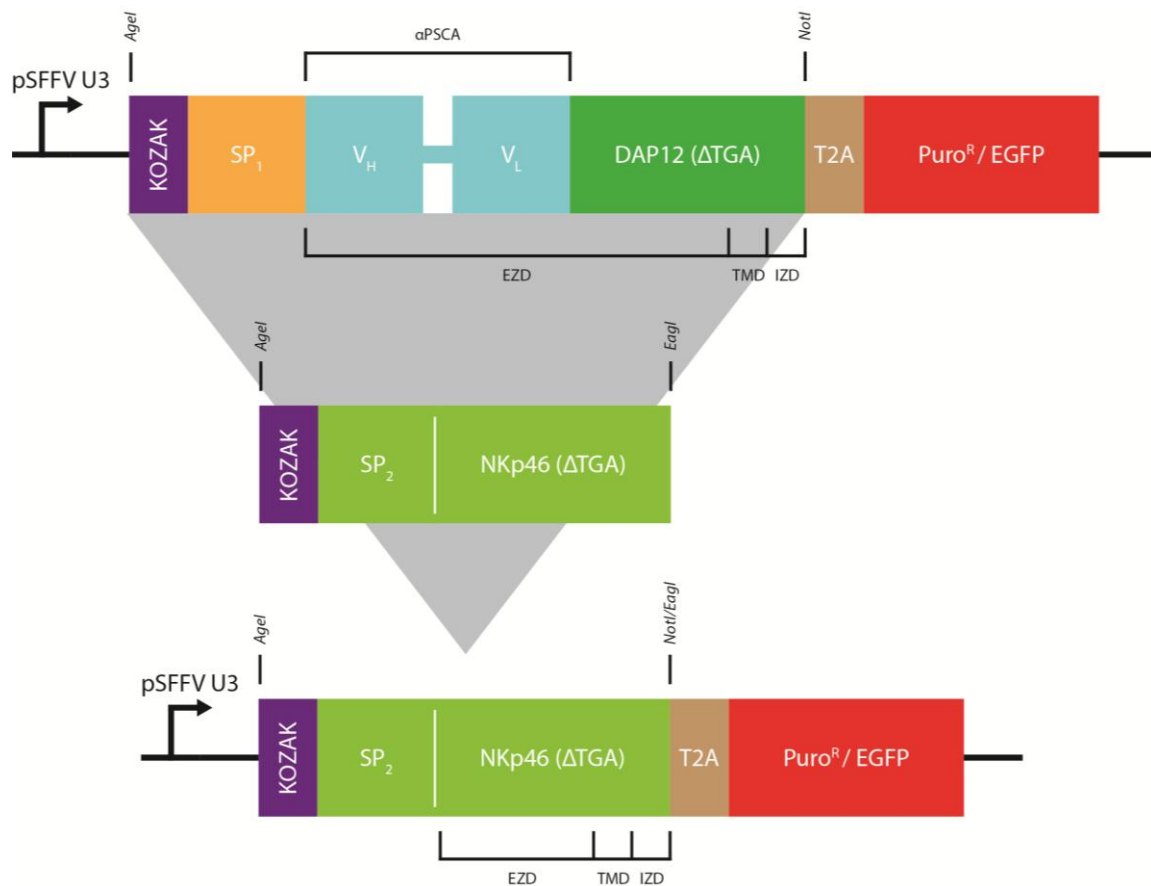


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klonierung des Kontrollkonstrukts NKp46-CDS in den lentiviralen Expressionsvektor pHATrick. Nach Entfernung des CAR α PSCA-DAP12 aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP mittels der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI* wurde das aus dem Vektor pCR2.1-NKp46-CDS mittels *AgeI* und *EagI* ausgeschnittene NKp46-CDS eingefügt. Durch die Kompatibilität der Restriktionsschnittstellen *NotI* und *EagI* wurden die Vektoren pHATrick-NKp46-CDS-Puro^R bzw. -EGFP generiert. Sie kodieren für die Wildtypform von NKp46. Die NKp46-CDS-Expression wird durch den Promotor pSFFV U3 reguliert.

(pSFFV U3: U3-Promotor des „Spleen Focus Forming Virus“; SP₁: murines Igk-Signalpeptid; V_H: schwere Kette des Einzelkettenantikörpers; V_L: leichte Kette des Einzelkettenantikörpers; T2A: proteolytische Spaltstelle des *Thossea asigna Virus*; SP₂: Signalpeptid von NKp46; Puro^R: Puromycinresistenz; EGFP: „Enhanced Green Fluorescent Protein“; EZD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrandomäne; IZD: intrazelluläre Domäne)

Die Kurzkontrollkonstrukte NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA bestehen aus einem C-terminal um 30 Aminosäuren verkürzten NKp46, wodurch ihnen die intrazelluläre Domäne fehlt. Des Weiteren wurden, getrennt vom restlichen NKp46 durch einen Glycin-Serin-Linker, C-terminal ein HA-Epitop zum Nachweis des Konstrukts sowie die sich anschließende Restriktionsendonukleaseschnittstelle *EagI* über antisense-Primer eingebracht. N-terminal wurde die Schnittstelle *AgeI* bzw. *SphI* angefügt. Die schematische Klonierung ist in Abbildung 5 dargestellt. Die entsprechenden Vektorkarten und Sequenzen sind im Anhang zu finden.

Die Generierung des Kurzkontrollkonstrukts NKp46-CDS-k erfolgte mittels PCR mit Hilfe der beiden Primer NKp46-kurz-for und NKp46-kurz-rev (Tabelle 16), wobei der Kontrollvektor pHATrick-NKp46-CDS-EGFP als DNA-Template genutzt wurde. Anschließend wurde das Amplifikationsprodukt an den eingefügten Restriktionsendonukleaseschnittstellen *AgeI* und *EagI* geschnitten. Gleichzeitig erfolgte die Entfernung des CAR α PSCA-DAP12 aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und pHATrick- α PSCA-DAP12-EGFP mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI*. Durch die Kompatibilität der Schnittstellen *EagI* und *NotI* entstanden die Vektoren pHATrick-NKp46-CDS-k-Puro^R und pHATrick-NKp46-CDS-k-EGFP (Abbildung 5a). Sie kodieren für ein C-terminal um seine intrazelluläre Domäne verkürztes NKp46. Da NK-Zellen *per se* NKp46 exprimieren, sollte mit Hilfe dieser Kontrolle gezeigt werden, dass die Überexpression des verkürzten NKp46 keine NK-Zellaktivierung induziert.

Zur Herstellung des Kurzkontrollkonstrukts NKp46-k- α PSCA wurde das verkürzte NKp46 mittels PCR unter Verwendung der beiden Primer PSCA-kurz-for und NKp46-kurz-rev (Tabelle 16) generiert. Als DNA-Template diente der zuvor hergestellte Kontrollvektor pHATrick-NKp46-CDS-Puro^R. Das Amplifikationsprodukt wurde mittels des „TA pCR2.1 Cloning Kits“ (Invitrogen) in den pCR2.1-Vektor subkloniert. Anschließend wurde das verkürzte NKp46 über die Restriktionsendonukleaseschnittstellen *SphI* und *EagI* ausgeschnitten. Parallel dazu wurde DAP12 mittels der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *NotI* aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und pHATrick- α PSCA-DAP12-EGFP entfernt. Da die Schnittstelle *EagI* mit *NotI* kompatibel ist, wurden die Vektoren pHATrick-NKp46-k- α PSCA-Puro^R beziehungsweise pHATrick-NKp46-k- α PSCA-EGFP generiert (Abbildung 5b). Diese kodieren für einen CAR, der am C-Terminus um die intrazelluläre Domäne des NKp46 verkürzt ist. Mit diesem Konstrukt sollte untersucht werden, ob der Verlust der intrazellulären Domäne ein abgeschwächtes zytotoxisches Potenzial im Vergleich zum Vollängenkonstrukt zur Folge hat.

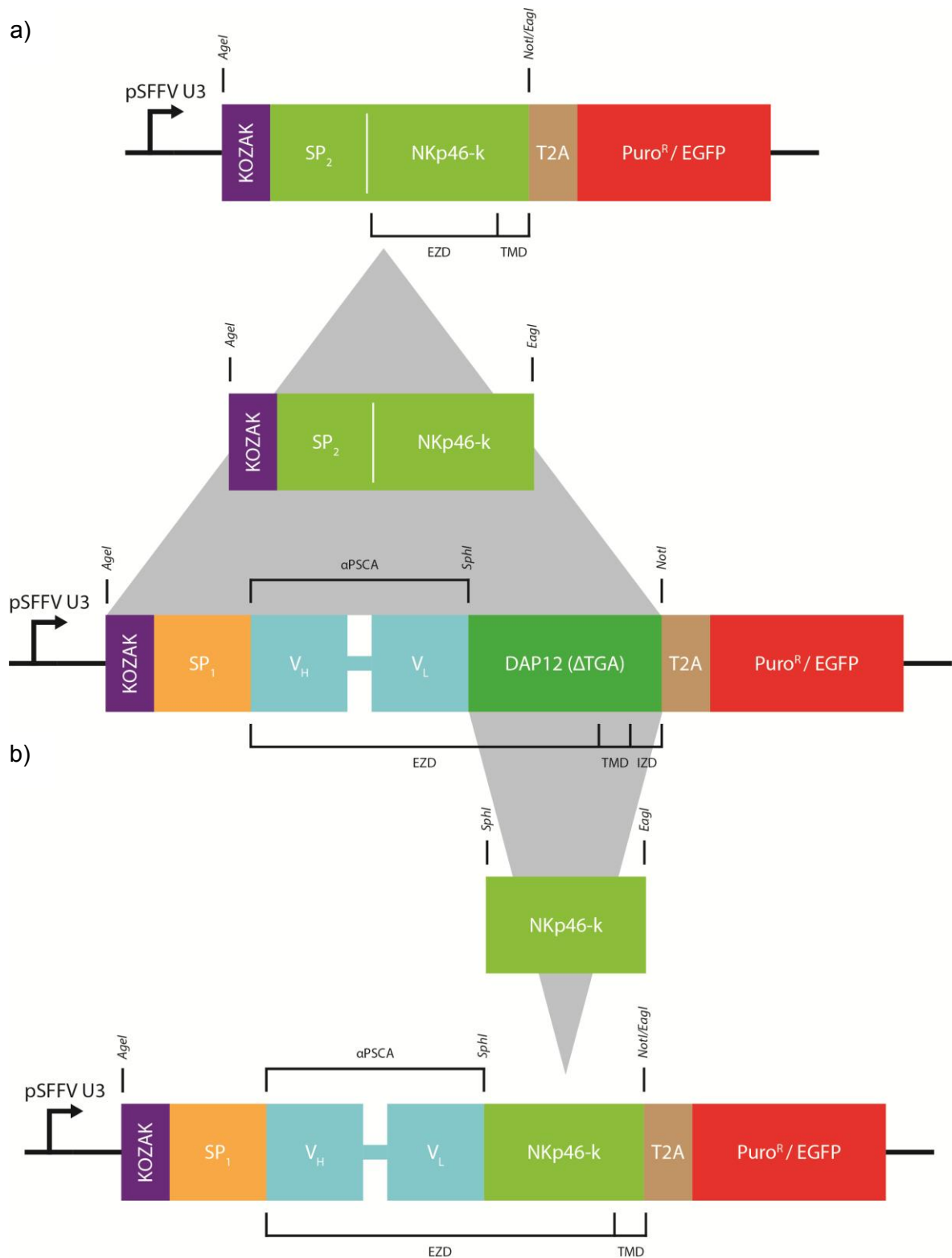


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Klonierung der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA in den lentiviralen Expressionsvektor pHATrick. Die Kontrollkonstrukte wurden C-terminal um ihre intrazelluläre Domäne verkürzt und um ein HA-Epitop erweitert. Die Generierung erfolgte mittels PCR mit Hilfe spezifischer Primer. Die Expression der Kontrollkonstrukte wurde durch den Promotor pSFFV U3 reguliert.

a) Das generierte NKp46-CDS-k wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *EagI* geschnitten und in die Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP nach Entfernung des CAR α PSCA-DAP12 über *AgeI* und *NotI* eingefügt. Durch Kompatibilität der Restriktionsschnittstellen *NotI* und *EagI* wurden die Vektoren pHATrick-NKp46-CDS-k-Puro^R bzw. -EGFP hergestellt. b) Nach Herausschneiden von DAP12

mittels der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *NotI* aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP wurde das verkürzte NKp46 eingebracht und die Vektoren pHATrick-NKp46-k- α PSCA-Puro^R bzw. -EGFP generiert.

(pSFFV U3: U3-Promotor des „Spleen Focus Forming Virus“; SP₁: murines Igk-Signalpeptid; V_H: schwere Kette des Einzelkettenantikörpers; V_L: leichte Kette des Einzelkettenantikörpers; T2A: proteolytische Spaltstelle des *Thosea asigna Virus*; SP₂: Signalpeptid von NKp46; NKp46-CDS-k: NKp46 ohne intrazelluläre Domäne; NKp46-k- α PSCA: CAR bei dem NKp46 um seine intrazelluläre Domäne verkürzt wurde; Puro^R: Puromycinresistenz; EGFP: „Enhanced Green Fluorescent Protein“; EZD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrandomäne; IZD: intrazelluläre Domäne)

3.1.3 Charakterisierung der CAR-armierten YTS NK-Zellen

3.1.3.1 Nachweis des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA

Die Armierung der YTS NK-Zellen erfolgte zum einen mit dem Expressionsvektor pHATrick-NKp46- α PSCA (3.1.1) für den gegen PSCA gerichteten CAR und zum anderen mit den drei Kontrollvektoren pHATrick-NKp46-CDS, pHATrick-NKp46-CDS-k und pHATrick-NKp46-k- α PSCA (3.1.2). Dazu wurden lentivirale Partikel mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T generiert (2.5.2). Durch die sich anschließende Transduktion der YTS NK-Zellen mit den lentiviralen Partikeln wurden der CAR NKp46- α PSCA beziehungsweise die Kontrollkonstrukte stabil ins Genom integriert, so dass eine dauerhafte Genexpression gewährleistet wurde (2.5.3.1). Bei Verwendung der pHATrick-Vektoren mit dem Puromycinresistenzgen erfolgte im Anschluss eine Selektion mit 13 μ g/ml Puromycin für 48 Stunden, um eine homogene YTS NK-Zellpopulation zu erhalten.

Die Expression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte auf der YTS NK-Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft (2.5.4). Dazu wurden der Antikörper anti-NKp46-PE und die entsprechende Isotypkontrolle von Miltenyi verwendet. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse einer repräsentativen Färbung aus fünf dargestellt.

Sowohl bei den YTS-NKp46- α PSCA als auch bei den YTS NK-Zellen mit den Kontrollkonstrukten wurde eine wesentlich verstärkte NKp46-Oberflächenexpression im Vergleich zu den YTS Wildtyp-NK-Zellen nachgewiesen. Da YTS Wildtyp-NK-Zellen bereits zu 98 % endogenes NKp46 exprimieren, wurden sie als zusätzliche Kontrolle mitgeführt (Abbildung 6, Histogramm 1). Die verstärkte NKp46-Oberflächenexpression wurde auch anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) gezeigt, die zwischen 24 und 278 für die transduzierten YTS NK-Zellen lagen, wohingegen der Wildtyp nur eine MFI von 13 hatte (Abbildung 6, Histogramm 2 - 5). Jedoch war die Oberflächenexpression der um ihre intrazelluläre Domäne verkürzten Kurzkontrollkonstrukte NKp46-CDS-k (MFI 84) und

NKp46-k- α PSCA (MFI 24) geringer als die Expression der entsprechenden Volllängenkonstrukte NKp46-CDS (MFI 278) und NKp46- α PSCA (MFI 31).

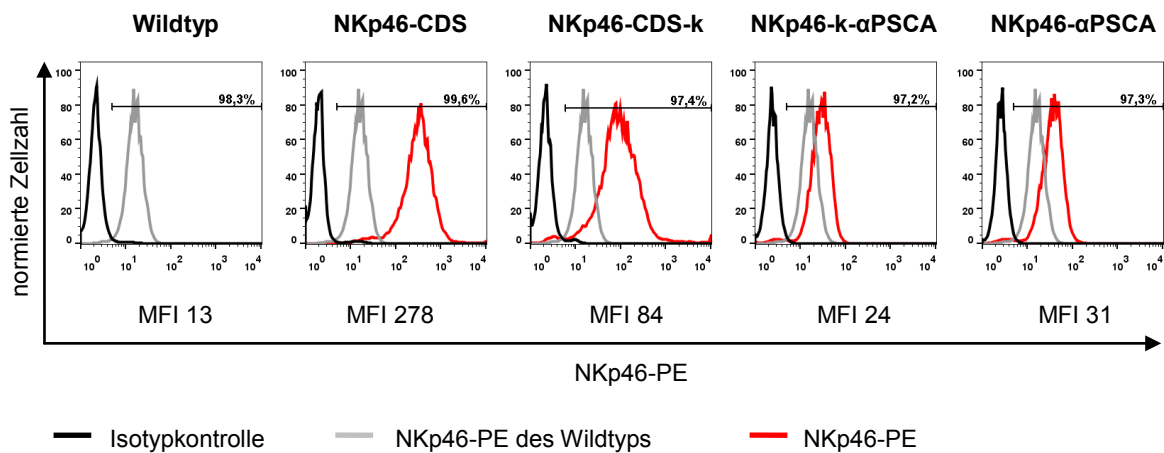


Abbildung 6: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA auf den mit Puromycin selektionierten YTS NK-Zellen. Als weitere Kontrolle wurden YTS Wildtyp-NK-Zellen untersucht, da diese endogenes NKp46 exprimieren. Die Färbung der YTS NK-Zellen erfolgte mit anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi). Die angegebenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) ergaben sich nach Abzug der Isotypkontrollwerte.

3.1.3.2 Nachweis verschiedener Oberflächenmarker

Verschiedene Oberflächenmarker auf den YTS NK-Zellen können das spezifische zytotoxische Potenzial CAR-armerter YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien im Vergleich zu den YTS Kontrollzellen beeinflussen. Um dies abzuschätzen, wurde die Expression der Liganden-Rezeptor-Paare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 überprüft, die eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen.

Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 3), wobei drei unabhängige Färbungen durchgeführt wurden. Nach Abzug der Isotypkontrollen wurden daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (Abbildung 7). Von den in die Apoptose-Induktion involvierten Oberflächenmarkern FasL, FasR, TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 wurde nur FasR zu 69,4 % auf den YTS Wildtyp-NK-Zellen nachgewiesen (Abbildung 7, Säule 2).

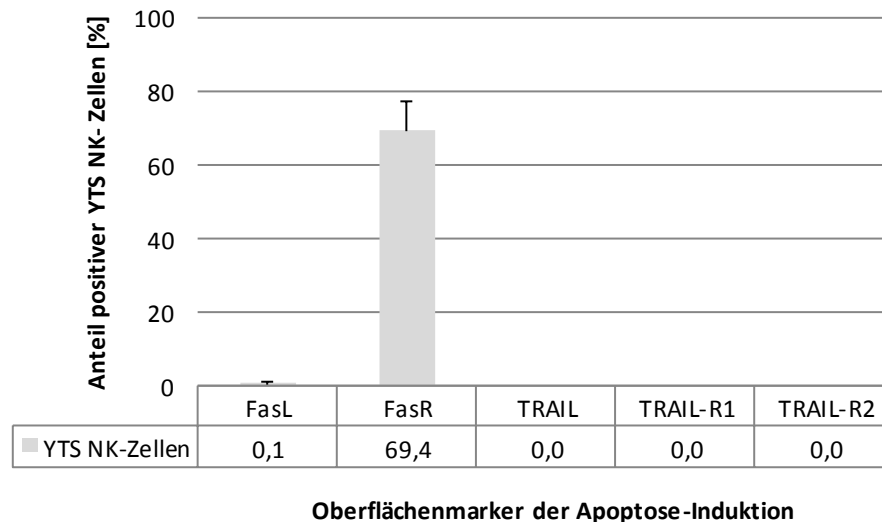


Abbildung 7: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf YTS Wildtyp-NK-Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte gegen die in die Apoptose-Induktion involvierten Moleküle FasL, FasR, TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Nach Abzug der Isotypkontrolle wurden von drei unabhängigen Färbungen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und im Diagramm dargestellt.

3.1.4 Charakterisierung der CAR-armierten primären humanen NK-Zellen

3.1.4.1 Isolation von primären humanen NK-Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolation von primären humanen NK-Zellen aus dem peripheren Blut von drei gesunden Spendern erfolgte nach dem unter 2.5.1.2 beschriebenen Protokoll. Dabei wurden zunächst die peripheren mononukleären Blutzellen („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMC) mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Anschließend wurden die primären NK-Zellen von den übrigen PBMC mittels magnetischer Microbeads (Miltenyi) isoliert. Ein Teil der Zellen aus jedem Aufreinigungsschritt wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die PBMC beziehungsweise NK-Zellen mittels anti-CD56-APC und anti-CD3-FITC (Miltenyi) sowie mit den entsprechenden Isotypkontrollen (Miltenyi) gefärbt. Somit war es möglich, die NK-Zellen über den CD56-Marker von den CD3-exprimierenden T-Zellen zu unterscheiden. Dadurch wurde die Reinheit der NK-Zellpopulation nach ihrer Isolation nachgewiesen. In Abbildung 8 ist eine repräsentative Färbung aus sechs dargestellt.

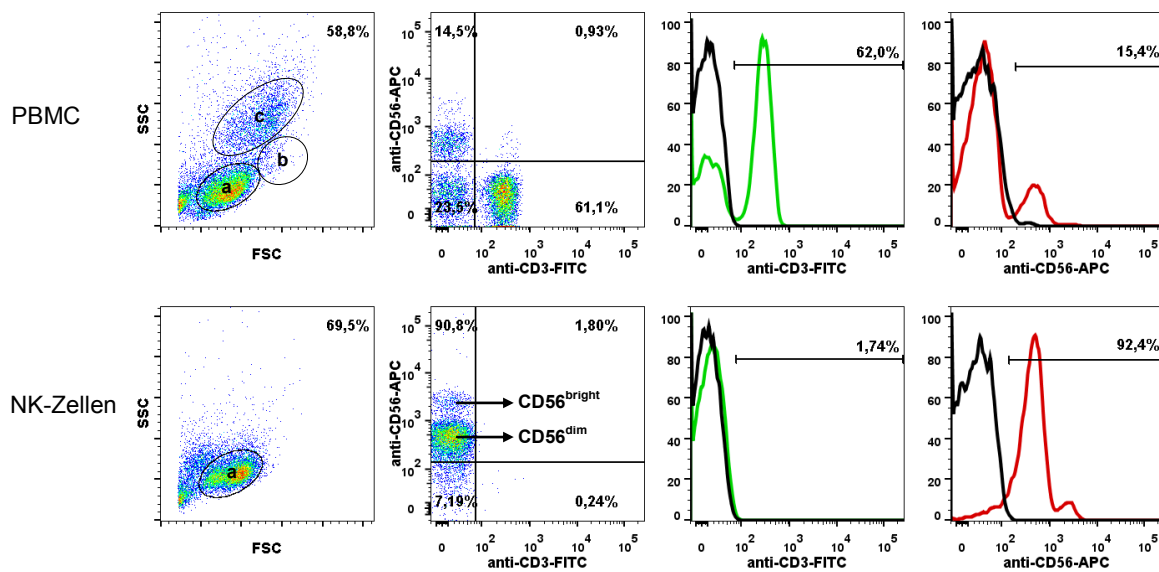


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Isolation und Aufreinigung von primären humanen NK-Zellen aus dem peripheren Blut. Zur Färbung der Zellpopulationen aus den beiden Aufreinigungsschritten wurde anti-CD56-APC (Miltenyi, rote Linie) zum Nachweis der NK-Zellen und anti-CD3-FITC (Miltenyi, grüne Linie) zum Nachweis der T-Zellen genutzt. Die entsprechenden Isotypkontrollen (Miltenyi, schwarze Linien) wurden mitgeführt. Bei den im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) dargestellten Populationen handelt es sich um a) Lymphozyten, b) Monozyten und c) Granulozyten.

Die im ersten Aufreinigungsschritt gewonnenen PBMC setzen sich aus den drei Zellpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zusammen. Dies wurde im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) deutlich (Abbildung 8, Punktdiagramm 1). Bei der weiteren durchflusszytometrischen Analyse wurde nur die Lymphozytenpopulation betrachtet, die wiederum aus T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen und NKT-Zellen besteht. Mittels anti-CD3-FITC wurde gezeigt, dass 62,0 % der Lymphozyten T-Zellen waren (Abbildung 8, Histogramm 1). Weitere 15,4 % der Lymphozyten wurden mit Hilfe von anti-CD56-APC als NK-Zellen identifiziert (Abbildung 8, Histogramm 2). Jedoch gab es auch einen geringen Teil an Zellen (0,93 %), die sowohl CD3 als auch CD56 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 8, Punktdiagramm 2). Dabei handelte es sich um NKT-Zellen.

Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt mittels des „NK Cell Isolation Kits“ (Miltenyi) wurde im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht (FSC-SSC) nur noch die Lymphozytenpopulation nachgewiesen (Abbildung 8, Punktdiagramm 3). Die größeren und granulärereren Monozyten und Granulozyten wurden bei der Aufreinigung entfernt. Bei der weiteren durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozytenpopulation wurde mittels anti-CD3-FITC gezeigt, dass ebenfalls keine T-Zellen (1,7 %) mehr vorhanden waren (Abbildung 8, Histogramm 3). Jedoch wurde mit Hilfe von anti-CD56-APC nachgewiesen, dass es sich bei 92,4 % der Lymphozyten um NK-Zellen handelte und somit eine sehr reine NK-Zellpopulation

aufgereinigt wurde (Abbildung 8, Histogramm 4). Diese bestand bei näherer Betrachtung der CD56-Färbung aus zwei Subpopulationen: einer großen Population mit einer geringen CD56-Dichte ($CD56^{\text{dim}}$) und einer kleinen Population mit einer hohen CD56-Dichte ($CD56^{\text{bright}}$) (Abbildung 8, Punktdiagramm 4).

Die so isolierten primären NK-Zellen wurden mittels des „NK Cell Activation/Expansion Kits“ (Miltenyi) aktiviert und zur Proliferation angeregt. Unterstützend wirkten dabei auch die dem Kultivierungsmedium zugegebenen Zytokine IL-2 und IL-21. In einem anschließenden Versuch wurde die NK-Zellproliferation *in vitro* mittels einer CFSE-Färbung überprüft.

3.1.4.2 Nachweis der NK-Zellproliferation mittels CFSE-Färbung

Zur Überprüfung der NK-Zellproliferation und zur Identifikation des besten Zeitpunktes für den Start der NK-Zelltransduktion wurde eine CFSE-Färbung (2.5.1.3) durchgeführt. CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester) ist ein grün fluoreszierender Lebendfarbstoff, der sich im Zytosol von Zellen einlagert, so dass er bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Somit ist anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität die Zellproliferation nachweisbar. In Abbildung 9 ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse einer solchen CFSE-Färbung aus drei über den Zeitraum von fünf Tagen dargestellt.

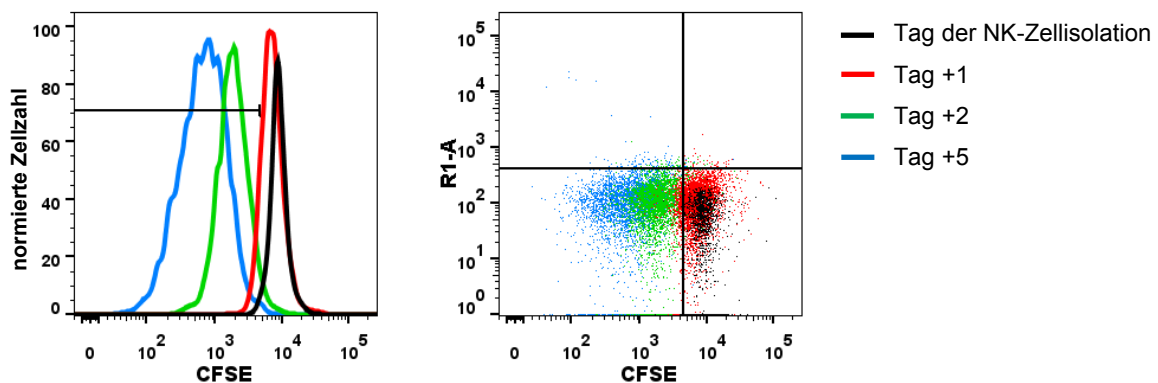


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse einer CFSE-Färbung von aktivierten, primären humanen NK-Zellen eines gesunden Spenders. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden die Abnahme der CFSE-Fluoreszenzintensität und die damit zunehmende Proliferation der NK-Zellen festgehalten.

Wie in Abbildung 9 anhand der sich verringernden CFSE-Fluoreszenzintensität gezeigt, begann die Proliferation und damit die Expansion der primären humanen NK-Zellen zwischen Tag 1 und 2 nach ihrer Isolation. Dabei gab es leichte Schwankungen zwischen den verschiedenen Spendern. Als durchschnittlicher Startpunkt der NK-Zellproliferation wurde der zweite Tag nach der NK-Zellisolation ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt wurde in

nachfolgenden Versuchen die NK-Zelltransduktion (2.5.3.2) begonnen, um die hohe Zellteilungsfrequenz der einsetzenden Expansion auszunutzen. Diese ermöglichte eine effektive Integration des in die NK-Zelle eingebrachten, rekombinanten Gens in das Zellgenom. Zudem stand ab diesen Zeitpunkt eine ausreichende Menge an NK-Zellen für die Transduktion zur Verfügung.

3.1.4.3 Nachweis des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA

Zur Transduktion der primären humanen NK-Zellen wurden zunächst lentivirale Partikel mit dem Expressionsvektor pHATrick-NKp46- α PSCA (3.1.1) sowie den drei Kontrollvektoren pHATrick-NKp46-CDS, pHATrick-NKp46-CDS-k und pHATrick-NKp46-k- α PSCA (3.1.2) in HEK293T-Zellen generiert (2.5.2). Zwei Tage nach Isolation der primären NK-Zellen erfolgte deren erste Transduktion (2.5.3.2). Durch den lentiviralen Gentransfer wurden der CAR NKp46- α PSCA beziehungsweise die Kontrollkonstrukte stabil in das Genom der NK-Zellen integriert. Bei Verwendung der pHATrick-Vektoren mit dem Puromycinresistenzgen erfolgte zwei Tage nach der letzten Transduktion eine Selektion mit 10 μ g/ml Puromycin für sechs bis acht Stunden, um eine möglichst homogene NK-Zellpopulation zu erhalten.

Die Oberflächenexpression der in die primären humanen NK-Zellen eingebrachten Konstrukte wurden mit Hilfe von anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi) durchflusszytometrisch ermittelt. Auch hier wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Transduktionen sowie die Standardabweichung bestimmt (Abbildung 10).

Die NKp46-Oberflächenexpression auf den Wildtyp-NK-Zellen und den modifizierten NK-Zellen der einzelnen Spender war sehr heterogen. So exprimierten, abhängig vom Spender, zum Beispiel zwischen 14,9 % und 28,2 % der Wildtyp-NK-Zellen endogenes NKp46 (Abbildung 10, Säulen 1 - 3). Des Weiteren schwankte die Transduktionseffizienz zwischen den unabhängigen Transduktionen eines Spenders, zum Beispiel lag der Anteil NKp46- α PSCA-exprimierender NK-Zellen nach Puromycinselektion bei Spender 1 zwischen 17,4 % und 59,0 %, bei Spender 2 zwischen 6,2 % und 27,1 % und bei Spender 3 zwischen 7,0 % und 83,3 %.

Jedoch wurden spenderunabhängig, wie schon bei den YTS NK-Zellen beschrieben (3.1.3), folgende Beobachtungen gemacht: Bei den NK-Zellen, die mit den Kontrollkonstrukten NKp46-CDS und NKp46-CDS-k transduziert worden waren, wurde eine wesentlich verstärkte NKp46-Oberflächenexpression im Vergleich zu den Wildtyp-NK-Zellen nachgewiesen (Abbildung 10). Allerdings war die Oberflächenexpression des CAR NKp46- α PSCA (14,5 % - 37,5 %) geringer als die der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS (81,2 % - 90,2 %) und NKp46-CDS-k (52,5 % - 78,5 %). Des Weiteren wurden die um ihre

intrazelluläre Domäne verkürzten Kurzkontrollkonstrukte NKp46-CDS-k (52,5 % - 78,5 %) und NKp46-k- α PSCA (14,1 % - 40,3 %) mit nur einer Ausnahme schlechter exprimiert als die entsprechenden Volllängenkonstrukte NKp46-CDS (81,2 % - 90,2 %) und NKp46- α PSCA (14,5 % - 37,5 %).

Zusammengefasst war die Expression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte zum einen abhängig vom Spender und zum anderen von ihrer Größe. So wurden die NKp46-CDS-Konstrukte besser exprimiert als die entsprechenden CAR-Konstrukte. Trotzdem wurden zum Teil sehr gute Expressionsraten in den schwer zu transduzierenen, primären humanen NK-Zellen erzielt.

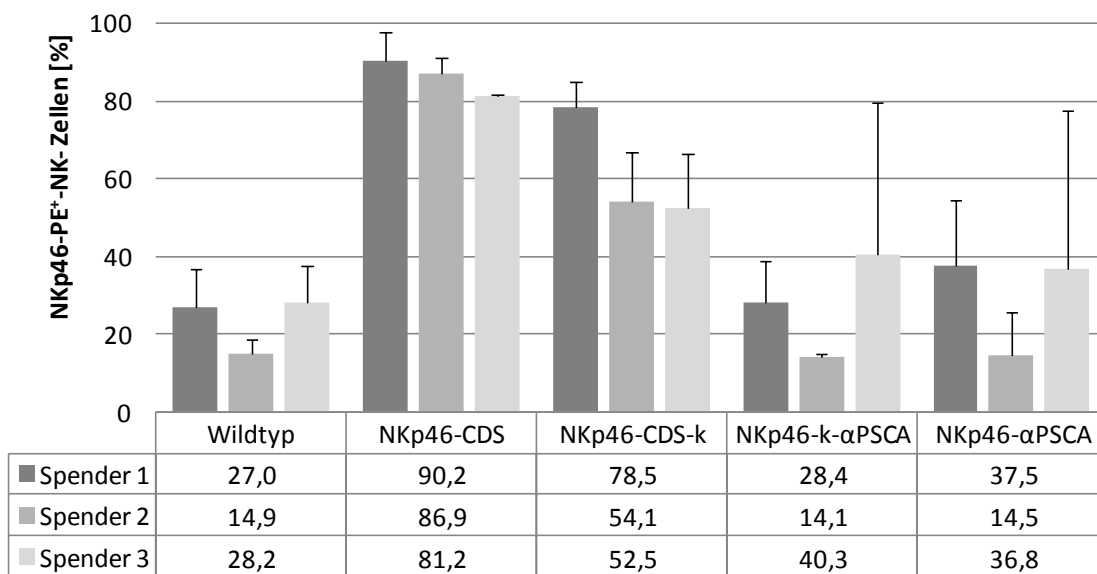


Abbildung 10: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA auf den mit Puromycin selektionierten, primären NK-Zellen von drei gesunden Spendern. Als weitere Kontrolle wurden Wildtyp-NK-Zellen untersucht, da diese endogenes NKp46 exprimieren. Die Färbung der NK-Zellen erfolgte mit anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi). Dargestellt ist der Mittelwert der NKp46-Oberflächenexpression von drei unabhängigen Transduktionen je Spender. Die angegebenen Prozentsätze ergaben sich nach Abzug der Isotypkontrolle.

3.1.4.4 Nachweis verschiedener Oberflächenmarker

Es wurde die Oberflächenexpression der Liganden-Rezeptor-Paare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 überprüft, die eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen. Diese können das zytotoxische Potenzial CAR-armerter NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen beeinflussen.

Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 3), wobei drei unabhängige Färbungen durchgeführt wurden. Nach Abzug der Isotypkontro-

llen wurden daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (Abbildung 11). Nur der in die Apoptose-Induktion involvierte FasR wurde spenderabhängig zu 31,2 % - 49,2 % auf den untersuchten NK-Zellen exprimiert (Abbildung 11, Säule 3 und 4).

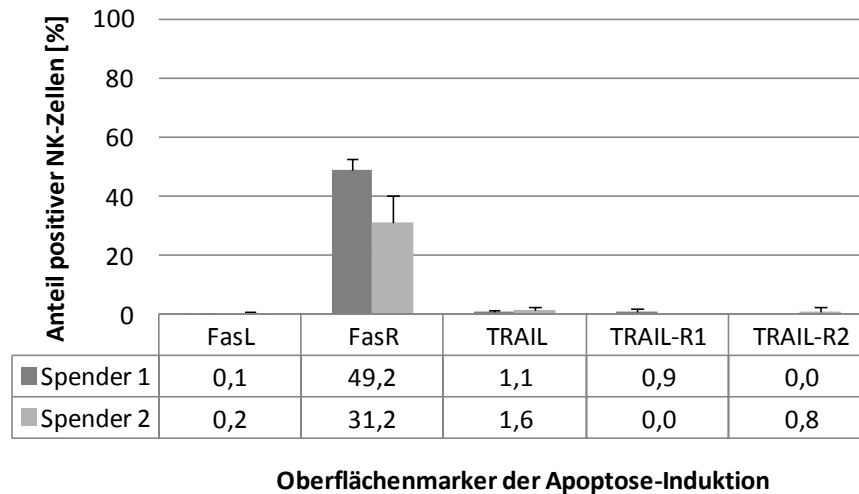


Abbildung 11: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf den NK-Zellen von zwei gesunden Spendern. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte gegen die in die Apoptose-Induktion involvierten Moleküle FasL, FasR, TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Nach Abzug der Isotypkontrolle wurden von drei unabhängigen Färbungen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und im Diagramm dargestellt.

3.1.5 Charakterisierung der humanen Tumorzelllinien

Die Charakterisierung der verwendeten humanen Tumorzelllinien erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse der Zellen am MACS Quant (Miltenyi). Die Tumorzellen, die als Zielzellen zur Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der CAR-armierten YTS und primären humanen NK-Zellen dienten, wurden mit spezifischen Antikörpern gegen PSCA und einige andere Oberflächenmarker, die Einfluss auf das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen haben, markiert. Bei den verwendeten Tumorzelllinien handelt es sich um die embryonalen Nierenkarzinomzelllinien HEK293T und HEK293T-PSCA, die Glioblastomzelllinien H4 und H4-PSCA sowie die Blasenkarzinomzelllinien HT1376 und RT-4 (Tabelle 22).

3.1.5.1 Nachweis der natürlichen und rekombinanten PSCA-Expression

Zur Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der mit dem CAR NKp46- α PSCA armierten YTS und primären humanen NK-Zellen wurden humane Tumorzelllinien eingesetzt, die natürlicherweise oder rekombinant PSCA auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zu ersteren gehören die Blasenkarzinomzelllinien HT1376 und RT-4 und zu letzteren die Nierenkarzi-

nomzelllinie HEK293T-PSCA sowie die Glioblastomzelllinie H4-PSCA. Durch die Verwendung dieser histogenetisch verschiedenen Tumorzelllinien war es möglich nachzuweisen, dass der CAR unabhängig von der Herkunft der Zielzellen sein Antigen erkennt und dadurch NK-Zellen aktiviert.

Die Analyse der PSCA-Expression erfolgte mit Hilfe des anti-PSCA (7F5) Antikörpers, wobei drei unabhängige Färbungen durchgeführt wurden (Abbildung 12). Nach Abzug der Isotypkontrollen wurden daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Als Kontrolle wurden die beiden PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4 eingesetzt.

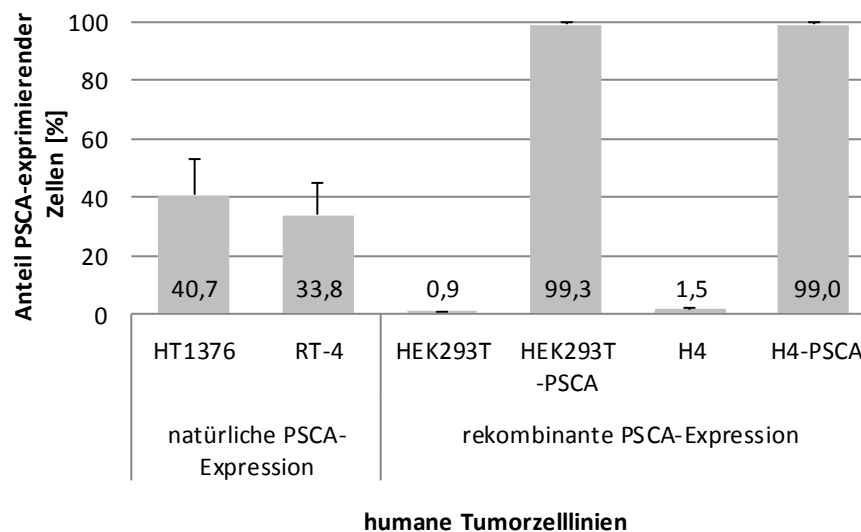


Abbildung 12: Nachweis der PSCA-Oberflächenexpression auf humanen Tumorzelllinien. Die natürlicherweise PSCA-exprimierenden Blasenkarzinomzelllinien HT1376 und RT-4 sowie die rekombinant PSCA-exprimierende Nierenkarzinomzelllinie HEK293T-PSCA und die Glioblastomzelllinie H4-PSCA wurden durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten die PSCA-negativen Ausgangszelllinien HEK293T und H4. Die Färbung erfolgte mit dem Primärantikörper anti-PSCA (7F5) und dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-Cy3. Als Isotypkontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nur mit dem Sekundärantikörper markiert wurden. Nach Abzug der Isotypkontrolle wurden von drei unabhängigen Färbungen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und im Diagramm dargestellt.

Das Antigen PSCA wurde auf allen Tumorzelllinien außer den Kontrollen nachgewiesen, wobei das Expressionslevel zwischen den natürlicherweise oder rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien stark schwankte (Abbildung 12). Die natürlicherweise PSCA-exprimierenden Zelllinien HT1376 (40,7 %) und RT-4 (33,8 %) wiesen dabei ähnlich hohe PSCA-Expressionen auf (Abbildung 12, Säule 1 und 2). Im Gegensatz dazu lag das Expressionslevel bei den rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA (99,3 %) und H4-PSCA (99,0 %) um mehr als das Doppelte höher (Abbildung 12, Säule 4 und 6). Aufgrund der konstitutiven PSCA-Expression bei diesen Zelllinien trugen fast alle Zellen das PSCA-Antigen auf ihrer Oberfläche. Die Ausgangs-

zelllinien HEK293T und H4 hingegen wiesen keine PSCA-Expression auf (Abbildung 12, Säule 3 und 5). Für nachfolgende Untersuchungen standen somit vier histogenetisch verschiedene, PSCA-exprimierende Tumorzelllinien beziehungsweise ihre parentalen PSCA-negativen Ausgangszelllinien zur Verfügung.

3.1.5.2 Nachweis verschiedener Oberflächenmarker

Verschiedene Oberflächenmarker auf den Tumorzelllinien können das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Um dies abzuschätzen, wurde zum einen die Expression der MHC-Moleküle HLA-ABC und HLA-E untersucht. Zum anderen wurde die Expression der Liganden-Rezeptor-Paare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 überprüft, die eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen. Außerdem wurde analysiert, ob die Stressproteine MIC A/B auf der Tumorzelloberfläche exprimiert wurden.

Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 3), wobei drei unabhängige Färbungen durchgeführt wurden. Nach Abzug der Isotypkontrollen wurden daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (Abbildung 13).

Alle Tumorzelllinien wiesen eine starke Expression von HLA-ABC (76,1 % - 98,4 %) auf (Abbildung 13, Diagramm 1). Außerdem wurde in geringem Maß HLA-E von den Tumorzelllinien RT-4 (7,6 %) und H4 (9,8 %) exprimiert, das an den inhibitorischen CD94/NKG2A NK-Zellrezeptor bindet. Die bei Zellstress exprimierten Proteine MIC A/B, die vom aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D erkannt werden, wurden nicht bei den HEK293T oder kaum bei den HT1376 (2,3 %) und H4 (1,3 %) auf der Oberfläche nachgewiesen (Abbildung 13, Diagramm 2). Hingegen exprimierten 10,2 % der RT-4 MIC A/B. Keine der verwendeten Tumorzelllinien exprimierte FasL (Abbildung 13, Diagramm 3). Die FasR-Expression war außer bei der RT-4-Zelllinie (48,9 %) nur sehr schwach ausgeprägt, was einen Immunevasionsmechanismus der Tumorzellen darstellt. Die Expressionslevel von TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 lagen bei fast allen Tumorzelllinien bei 0 % (Abbildung 13, Diagramm 4). Nur auf HT1376 war eine sehr schwache TRAIL-R1-Expression (2,5 %) nachweisbar. Auch TRAIL-R2 wurde nur zu 18,5 % von H4-Zellen exprimiert, was wie bei der FasR-Expression einen Immunevasionsmechanismus der Tumorzellen darstellt.

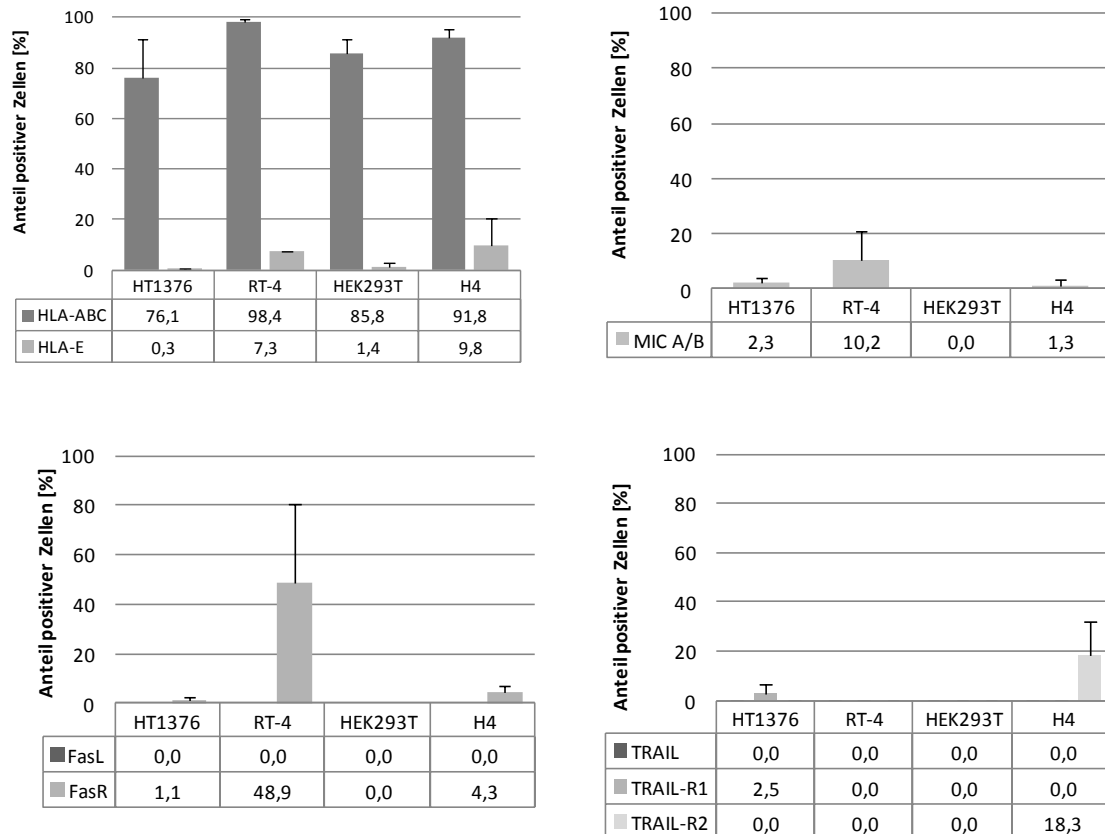


Abbildung 13: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf humanen Tumorzelllinien. Die durchflusszytometrische Analyse der Blasenkarzinomzelllinien HT1376 und RT-4 sowie der Nierenkarzinomzelllinie HEK293T und der Glioblastomzelllinie H4 erfolgte gegen die MHC-Moleküle HLA-ABC und HLA-E. Des Weiteren wurden die Expression der Stressproteine MIC A/B sowie der in die Apoptose involvierten Moleküle FasL, FasR, TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 untersucht. Nach Abzug der Isotypkontrolle wurden von drei unabhängigen Färbungen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und im Diagramm dargestellt.

3.1.6 Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der CAR-armierten YTS und primären humanen NK-Zellen *in vitro*

3.1.6.1 Chrom-Freisetzungssassay

Der Chrom-Freisetzungssassay (2.5.5.1) wurde angewendet, um die spezifische Lyse von PSCA-exprimierenden Tumorzellen durch die mit dem CAR NKp46- α PSCA armierten YTS und primären humanen NK-Zellen nachzuweisen. Dazu wurden die PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4, die rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA sowie die *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 mit radioaktiven Chrom (^{51}Cr) beladen. Anschließend erfolgte für 22 Stunden (YTS) beziehungsweise vier Stunden (NK-Zellen) die Kokultivierung mit den

CAR NKp46- α PSCA armierten YTS beziehungsweise primären humanen NK-Zellen. Dabei wurden verschiedene Verhältnisse von Zielzellen zu Effektorzellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Wildtyp-NK-Zellen sowie mit den Kontrollkonstrukten NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA modifizierte NK-Zellen mitgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lysen, die aus drei unabhängigen Versuchen erhoben wurden, sind für die YTS NK-Zellen in Abbildung 14 und für die primären humanen NK-Zellen in Abbildung 15 dargestellt. Die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

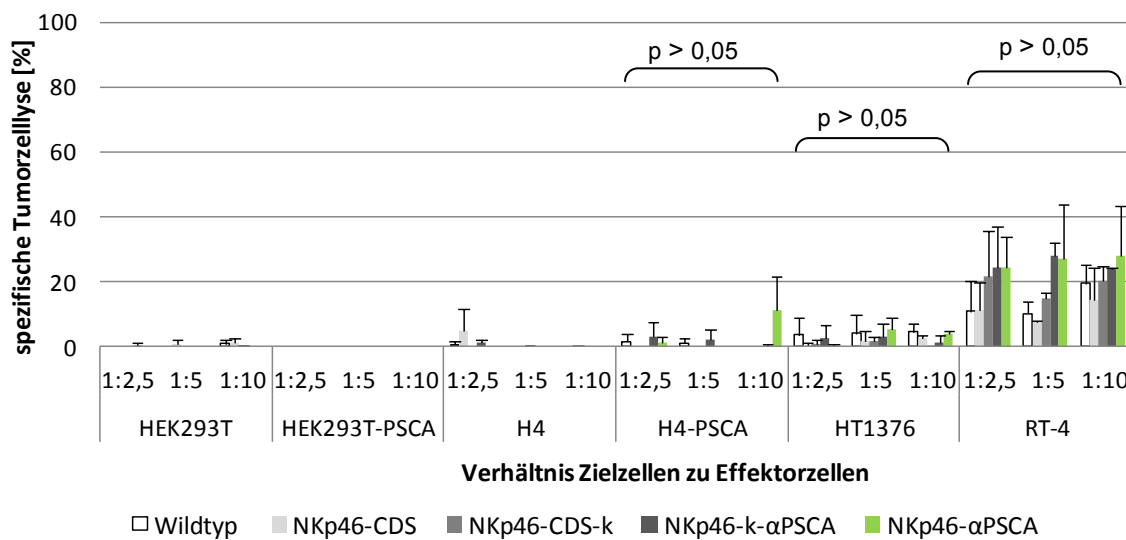


Abbildung 14: Spezifische Zytotoxizität von YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CAR-armierte YTS NK-Zellen (NKp46- α PSCA) und YTS Kontroll-NK-Zellen (Wildtyp, NKp46-CDS, NKp46-CDS-k, NKp46-k- α PSCA) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit ^{51}Cr beladenen PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA, H4-PSCA, HT1376, RT-4) und nicht exprimierenden (HEK293T, H4) Tumorzelllinien für 22 h kokultiviert. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

Zunächst wurden die modifizierten YTS NK-Zellen auf ihre Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien untersucht (Abbildung 14). Bei den PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4 wurde, wie erwartet, keine oder nur eine sehr geringe Lyse beobachtet, unabhängig von der kokultivierten YTS NK-Zelllinie. Jedoch war bei den rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe Lyse bei allen YTS NK-Zelllinien, auch bei den mit dem CAR gegen PSCA-armierten YTS NK-Zellen, nachweisbar. Nur bei der Kokultivierung mit H4-PSCA im Verhältnis Zielzellen zu Effektorzellen von 1:10 kam es zu einer schwachen spezifischen Lyse (11,3 %) durch die CAR-armierten YTS-NKp46- α PSCA, die jedoch nicht signifikant war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den *per se* PSCA-expri-

mierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 erzielt. Bei der Kokultivierung von YTS NK-Zellen mit den HT1376-Zellen wurden nur sehr geringe Lysen unabhängig von der kokultivierten YTS NK-Zelllinie beobachtet. Die Lyse der RT-4-Zellen lag je nach kokultivierter YTS NK-Zelllinie und dem Verhältnis von Zielzellen zu Effektorzellen zwischen 7,6 % und 28,3 % und war damit deutlich größer als bei allen anderen Tumorzelllinien. Dabei war die spezifische Lyse durch die CAR-armierten YTS-NKp46- α PSCA und NKp46-k- α PSCA im Vergleich zu den Kontrollzelllinien YTS Wildtyp, YTS-NKp46-CDS und YTS-NKp46-CDS-k allerdings nicht signifikant erhöht. Jedoch wurde eine wesentlich höhere spezifische Lyse durch die CAR-armierten YTS NK-Zellen erwartet.

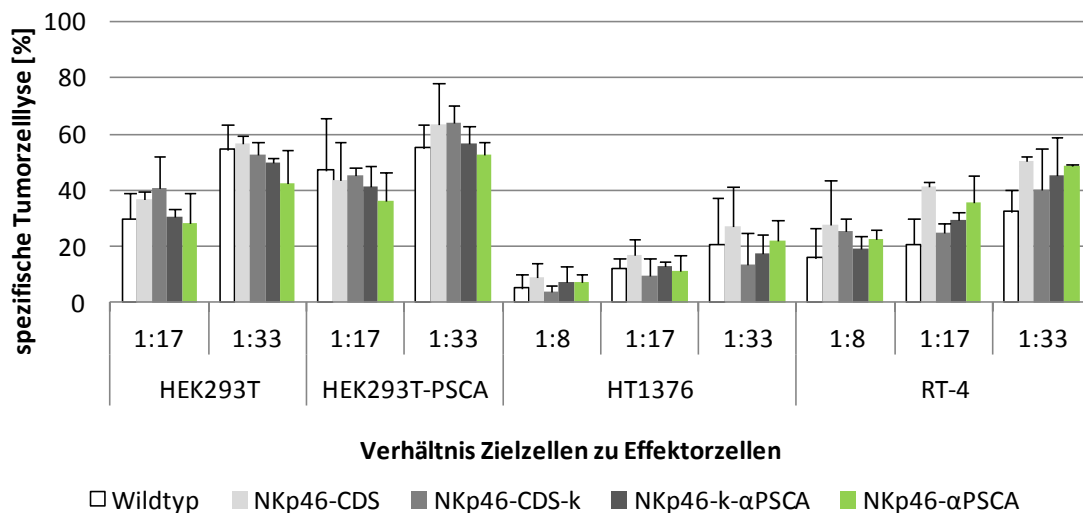


Abbildung 15: Spezifische Zytotoxizität von primären humanen NK-Zellen eines gesunden Spenders gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CAR-armierte NK-Zellen (NKp46- α PSCA) und Kontroll-NK-Zellen (Wildtyp, NKp46-CDS, NKp46-CDS-k, NKp46-k- α PSCA) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit ^{51}Cr beladenen PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA, HT1376, RT-4) und nicht exprimierenden (HEK293T) Tumorzelllinien für 4 h kokultiviert. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Die spezifische Zytotoxizität von primären humanen NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 15). Dabei kam es zu einer starken Zytotoxizität gegenüber der PSCA-negativen HEK293T-Zelllinie (28,7 % - 40,7 % im Verhältnis 1:17 und 42,3 % - 56,5 % im Verhältnis 1:33) unabhängig von der kokultivierten NK-Zelllinie. Auch die rekombinant PSCA-exprimierende Tumorzelllinie HEK293T-PSCA wurde unabhängig von der kokultivierten NK-Zelllinie im hohen Maß (36,4 % - 47,0 % im Verhältnis 1:17 und 52,9 % - 64,2 % im Verhältnis 1:33) lysiert. Diese CAR-unabhängige Lyse der Tumorzellen durch die primären NK-Zellen ließ sich ebenfalls bei den *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 beobachten. Jedoch fiel hier die unspezifische Zytotoxizität etwas geringer aus. Bei den HT1376 lag sie bei einem Verhältnis 1:17 von Zielzellen zu Effektorzellen zwischen 9,8 % und 16,7 % und bei einem

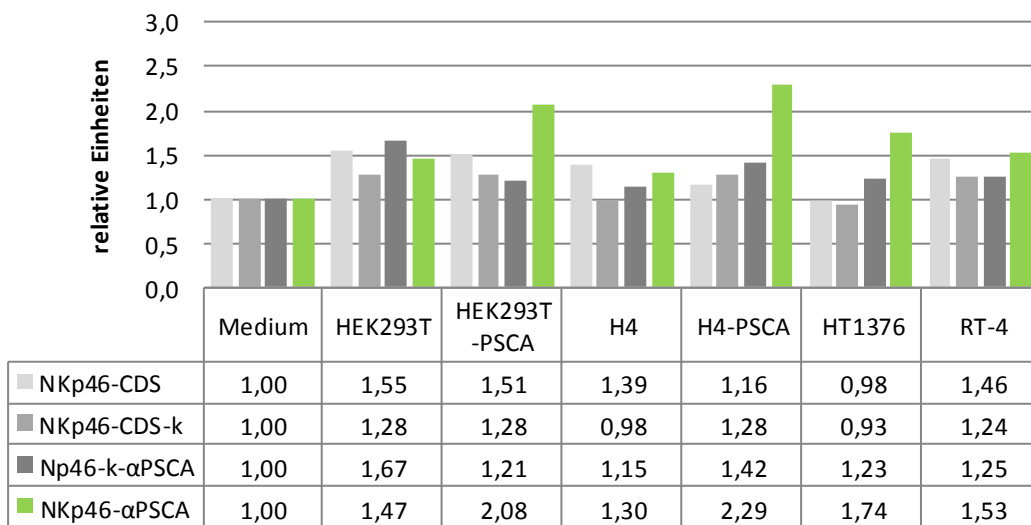
Verhältnis 1:33 von Zielzellen zu Effektorzellen zwischen 13,3 % - 27,1 %. Die RT-4 hingegen wurden zu 20,7 %- 41,5 % (1:17) beziehungsweise zu 32,5 % - 50,3 % (1:33) lysiert.

Im Chrom-Freisetzungssassay mit YTS und primären NK-Zellen konnte somit keine CAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen gezeigt werden. Als eine mögliche Ursache für die fehlende Zytotoxizität CAR-modifizierter NK-Zellen wurde die nicht ausreichend erhöhte Expression von CD3- ζ vermutet. Bei CD3- ζ handelt es sich um das mit NKp46 assoziierte Signaladapterprotein, das die aktivierenden Signale in das Zellinnere weiterleitet. Bei der Modifikation der YTS und primären humanen NK-Zellen mit dem CAR NKp46- α PSCA und den Kontrollkonstrukten erfolgte eine Überexpression von NKp46. Jedoch blieb eine gleichzeitige Überexpression von CD3- ζ aus, da von einer natürlich verstärkten CD3- ζ -Expression ausgegangen wurde. Um zu klären, welche Rolle das CD3- ζ -Expressionslevel spielt, wurden die im Kapitel 3.2 aufgeführten Experimente durchgeführt.

3.1.6.2 IFN- γ -Sekretion

Neben dem Chrom-Freisetzungssassay (2.5.5.1) wurde zur Untersuchung der Aktivierung von CAR-armierten NK-Zellen durch PSCA-exprimierende Tumorzellen die IFN- γ -Sekretion (2.5.5.2) der modifizierten NK-Zellen bestimmt. Dieses zytotoxische Zytokin wird von aktivierten NK-Zellen freigesetzt und dient der Abtötung von Zielzellen. Für diesen Versuch wurden die PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4, die rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA sowie die *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 mit CAR NKp46- α PSCA armierten, primären humanen NK-Zellen für sechs Stunden kokultiviert. Es wurde dabei ein Verhältnis von 1:5 von Zielzellen zu Effektorzellen genutzt. Als Kontrolle wurden mit den Kontrollkonstrukten NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA modifizierte NK-Zellen sowie eine Mediumkontrolle mit NK-Zellen ohne Zielzellen mitgeführt. Die Konzentration des in die Zellkulturüberstände sekretierten IFN- γ wurde anschließend mittels des „Human IFN- γ ELISA Sets“ (BD) in einer Doppelbestimmung ermittelt (2.4.1). In Abbildung 16 sind repräsentativ aus drei Versuchen die gegen die Mediumkontrolle normalisierten IFN- γ -Konzentrationen von zwei gesunden Spendern dargestellt.

Spender 1



Spender 2

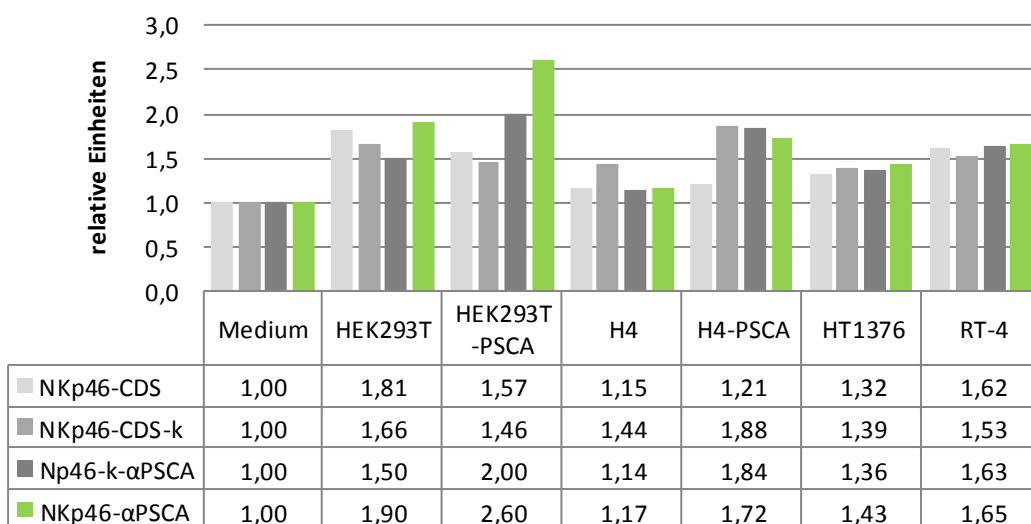


Abbildung 16: IFN- γ -Sekretion von primären humanen NK-Zellen zweier gesunder Spender gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CAR-armierte NK-Zellen (NKp46- α PSCA) und Kontroll-NK-Zellen (NKp46-CDS, NKp46-CDS-k, NKp46-k- α PSCA) wurden im Verhältnis 1:5 von Zielzellen zu Effektorzellen mit PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA, H4-PSCA, HT1376, RT-4) und nicht exprimierenden (HEK293T, H4) Tumorzelllinien für sechs Stunden kokultiviert. Die Konzentration des dabei in den Zellkulturüberstand sekretierten IFN- γ wurde mittels eines ELISA ermittelt. Es wurden die gegen die Mediumkontrolle (NK-Zellen ohne Zielzellen) normalisierten IFN- γ -Konzentrationen dargestellt.

Allgemein ließ sich bei beiden Spendern feststellen, dass es fast immer zu einer erhöhten IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen unabhängig vom eingebrachten Konstrukt kam, sobald diese mit Zielzellen kokultiviert wurden (Abbildung 16).

Bei Spender 1 wurde eine verstärkte IFN- γ -Sekretion der mit dem CAR NKp46- α PSCA armierten NK-Zellen gegenüber den mit den Kontrollkonstrukten modifizierten NK-Zellen bei der Kokultivierung mit den PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA, H4-PSCA und HT1376 ermittelt (Abbildung 16, Diagramm 1). Die IFN- γ -Konzentration war dabei maximal um die Faktoren 0,57 (HEK293T-PSCA), 0,87 (H4-PSCA) und 0,51 (HT1376) im Vergleich zu den Kontrollkonstrukten erhöht. Da dies gleichzeitig bei den PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4 nicht beobachtet wurde, kann somit von einer CAR-vermittelten, verstärkten IFN- γ -Sekretion ausgegangen werden. Nur bei den PSCA-exprimierenden RT-4 wurde keine gesteigerte IFN- γ -Sekretion CAR-armierter NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen nachgewiesen. Bei Spender 2 hingegen wurde nur eine CAR-vermittelte, verstärkte IFN- γ -Sekretion um den Faktor 0,6 im Vergleich zum Kontrollkonstrukt NKp46-k- α PSCA bei der Kokultivierung mit der PSCA-exprimierenden Tumorzelllinie HEK293T-PSCA ermittelt (Abbildung 16, Diagramm 2). Jedoch kam es im Gegensatz zu Spender 1 zu keiner Steigerung der IFN- γ -Sekretion bei der Kokultivierung der NK-Zellen mit den Tumorzelllinien H4-PSCA und HT1376. Ebenfalls wurde, wie bei Spender 1, keine CAR-vermittelte IFN- γ -Sekretion bei einer Kokultivierung mit der Tumorzelllinie RT-4 nachgewiesen.

Durch diesen Versuch wurde gezeigt, dass eine, in ihrer Stärke spenderabhängige, CAR-vermittelte Aktivierung von primären humanen NK-Zellen prinzipiell möglich ist. Als eine mögliche Ursache für die zum Teil ähnlich ausgeprägte IFN- γ -Sekretion CAR-modifizierter NK-Zellen im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion der Kontroll-NK-Zellen wurde die schon unter 3.1.6.1 beschriebene mangelnde Verfügbarkeit von CD3- ζ vermutet. Um die Bedeutung des CD3- ζ -Expressionslevels näher zu untersuchen, wurden die im Kapitel 3.2 aufgeführten Experimente durchgeführt.

3.2 Koexpression des chimären Antigenrezeptors NKp46- α PSCA und der CD3- ζ -Kette

Bei der Modifikation der YTS NK-Zellen mit dem CAR NKp46- α PSCA und den Kontrollkonstrukten kam es zu einer Überexpression von NKp46 (3.1.3.1 und 3.1.4.3). Da die Aktivierung der YTS NK-Zellen über das mit NKp46 assoziierte Signaladapterprotein CD3- ζ erfolgt, könnte eine nicht ausreichende Expression von CD3- ζ für die mangelnde Aktivierung und Zytotoxizität der NK-Zellen verantwortlich sein (3.1.6). Aus diesem Grund erfolgte die Überexpression der CD3- ζ -Kette in den CAR-armierten beziehungsweise mit den Kontrollkonstrukten versehenen NK-Zellen. Im Anschluss wurde der Einfluss dieser Modifikation auf die Aktivierung und das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen untersucht.

3.2.1 Generierung eines Expressionsvektors für die CD3- ζ -Kette

Für die Generierung des Expressionsvektors p6NST50-CD3-zeta stand keine für die CD3- ζ -Kette kodierende DNA zur Verfügung, so dass diese zunächst gewonnen werden musste. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen („Peripheral Blood Mononuclear Cells“, PBMC) mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders nach dem unter 2.5.1.2 beschriebenen Protokoll isoliert. Die zu den PBMC zählenden NK-Zellen und T-Zellen exprimieren die CD3- ζ -Kette, so dass entsprechend kodierende DNA-Abschnitte vorhanden waren. Die so isolierten PBMC wurden mittels des „RNeasy Plus Mini Kits“ (Quiagen) lysiert und homogenisiert, bevor im Anschluss ihre RNA extrahiert wurde. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific). Die Reinheit der so erhaltenen cDNA wurde mit Hilfe einer PCR (2.3.1) unter der Verwendung der beiden Primer MECL1-GCA1-for und MECL1-YS1-rev (Tabelle 16) überprüft. Im Anschluss wurde die CD3- ζ -Kette mittels einer PCR (2.3.1) synthetisiert, wobei die erhaltene cDNA als DNA-Template diente. Über den Primer CD3-zeta-I-for (Tabelle 16), der am N-Terminus der CD3- ζ -Kette band, wurde zusätzlich die sich in 5'-Richtung befindliche Restriktionsendonukleaseschnittstelle *HpaI* und ein über einen Glycin-Serin-Linker mit der CD3- ζ -Kette verbundenes myc-Epitop zum Nachweis des Konstrukts angefügt. C-terminal wurde die Restriktionsendonukleaseschnittstelle *NotI* über den Primer CD3-zeta-I-rev (Tabelle 16) an die CD3- ζ -Kette angefügt. Das so entstandene PCR-Produkt wurde mittels des „TA pCR2.1 Cloning Kits“ (Invitrogen) in den pCR2.1-Vektor subkloniert. Im Anschluss an eine Blau-Weiß-Selektion (2.2.4) wurde das CD3- ζ -Ketten-Konstrukt über die Restriktionsendonukleaseschnittstellen *HpaI* und *NotI* aus dem pCR2.1-Vektor ausgeschnitten.

Bei der anschließenden Generierung des Vektors p6NST50-CD3-zeta wurde der lentivirale Expressionsvektor p6NST50-myc-DAP12 (Tabelle 18) von Dr. Katrin Töpfer (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) als Ausgangsvektor genutzt. Die Expressionsregulation erfolgt bei diesem Vektor über einen in 5'-Richtung sich vor dem offenen Leserahmen befindlichen U3-Promotor des „*Spleen Focus Forming Virus*“ (pSFFV U3). Der folgende erste Bestandteil des Leserahmens ist das murine Ig κ -Signalpeptid. Es dient dem Zugang des sich anschließenden Konstrukts zum sekretorischen Signalweg. Dabei handelt es sich um das Signaladapterprotein DAP12, das N-terminal mit einem myc-Epitop verknüpft ist. Des Weiteren kodiert der Vektor für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Fluoreszenzmarker EGFP und dem Zeocinresistenzmarker Zeo^R. Die sich in 5'-Richtung befindliche interne ribosomale Eintrittsstelle („Internal Ribosomal Entry Site“, IRES) ermöglicht dabei die Translationsinitiation innerhalb der mRNA, so dass neben DAP12 separat das Fusionsprotein EGFP-Zeo^R synthetisiert wird.

Zur Generierung des Vektors p6NST50-CD3-zeta wurde aus dem Ausgangsvektor p6NST50-myc-DAP12 das Konstrukt myc-DAP12 mittels der Restriktionsendonukleasen *HpaI* und *NotI* entfernt. Im Anschluss wurde das bereits über die gleichen Restriktionsendonukleasen aus dem pCR2.1-Vektor ausgeschnittene Konstrukt CD3-zeta eingesetzt. Der so entstandene Vektor p6NST50-CD3-zeta kodiert für die mit einem myc-Epitop gekennzeichnete CD3- ζ -Kette sowie für das Fusionsmarkerprotein EGFP-Zeo^R (Abbildung 17). Die detaillierten Vektorkarten und Sequenzen zu dieser Klonierung sind im Anhang zu finden.

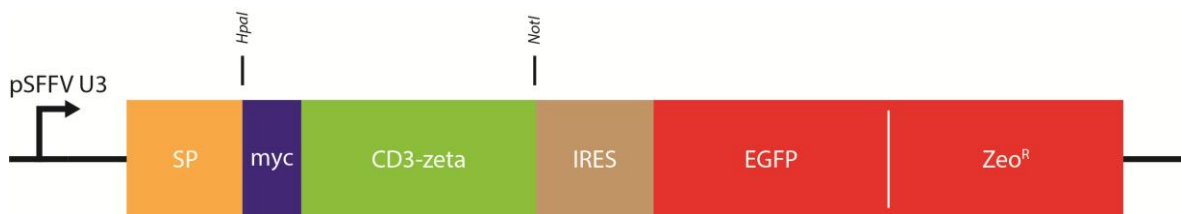


Abbildung 17: Schematische Darstellung des CD3- ζ -Ketten-Konstrukts. Die Expression wird durch den Promotor pSFFV U3 reguliert. Der anschließende Eintritt der CD3- ζ -Kette in den sekretorischen Weg wird durch das Ig κ -Signalpeptid vermittelt. Die separate Synthese des Fusionsmarkerproteins EGFP-Zeo^R wird durch die ribosomale Eintrittsstelle IRES ermöglicht, die die Translationsinitiation innerhalb einer mRNA gestattet.

(pSFFV U3: U3-Promotor des „*Spleen Focus Forming Virus*“; SP: murines Ig κ -Signalpeptid; CD3-zeta: CD3- ζ -Kette mit N-terminalem myc-Epitop; IRES: „Internal Ribosomal Entry Site“; EGFP: „Enhanced Green Fluorescent Protein“; Zeo^R: Zeocinresistenz)

3.2.2 Charakterisierung der CAR-armierten und CD3- ζ -Kette-exprimierenden YTS NK-Zellen

Die Überexpression der CD3- ζ -Kette erfolgte nicht nur in den YTS Wildtyp-NK-Zellen sondern auch zum einen in den mit CAR NKp46- α PSCA armierten YTS NK-Zellen und zum anderen in den mit den drei Kontrollkonstrukten NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA (3.1.3.1) modifizierten YTS NK-Zellen. Dazu wurden lentivirale Partikel mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T generiert (2.5.2). Durch die sich anschließende Transduktion der YTS NK-Zellen mit den lentiviralen Partikeln wurde die CD3- ζ -Kette mit angefügtem myc-Epitop stabil ins Genom integriert, so dass eine dauerhafte Genexpression gewährleistet wurde (2.5.3.1). Im Anschluss erfolgte eine Selektion mit 500 μ g/ml Zeocin für eine Woche, um eine homogene YTS NK-Zellpopulation zu erhalten.

Die Koexpression der CD3- ζ -Kette und des CAR NKp46- α PSCA beziehungsweise der Kontrollkonstrukte auf der YTS NK-Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft (2.5.4). Dabei wurden zum Nachweis der CD3- ζ -Kette neben dem Reporterprotein EGFP die Antikörper anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-APC von Miltenyi genutzt. Gleichzeitig wurde mittels des Antikörpers anti-NKp46-PE und der entsprechenden Isotypkontrolle von Miltenyi die Expression von NKp46 untersucht. In Abbildung 18 ist eine repräsentative Färbung aus fünf dargestellt. Alle hergestellten YTS-CD3- ζ -NK-Zelllinien waren zu über 99 % EGFP-positiv (Abbildung 18, Spalte 1). Damit wurde bestätigt, dass der Vektor p6NST50-CD3-zeta in die Gesamtheit der YTS NK-Zellen eingebracht wurde. Die Oberflächenexpression der CD3- ζ -Kette, die über das myc-Epitop ermittelt wurde, fiel etwas geringer aus, als das EGFP-Signal vermuten ließ (Abbildung 18, Spalte 2). Sie lag für alle YTS-CD3- ζ -NK-Zelllinien zwischen 90,2 % und 97,5 %. Damit gelang der Nachweis einer erfolgreichen Überexpression der CD3- ζ -Kette. Die Überexpression der CD3- ζ -Kette hatte keinen Einfluss auf die Expression des CAR NKp46- α PSCA oder dessen Kontrollkonstrukten (Abbildung 18, Spalte 3). Sie unterschied sich nicht wesentlich von der unter 3.1.3.1 beschriebenen Oberflächenexpression.

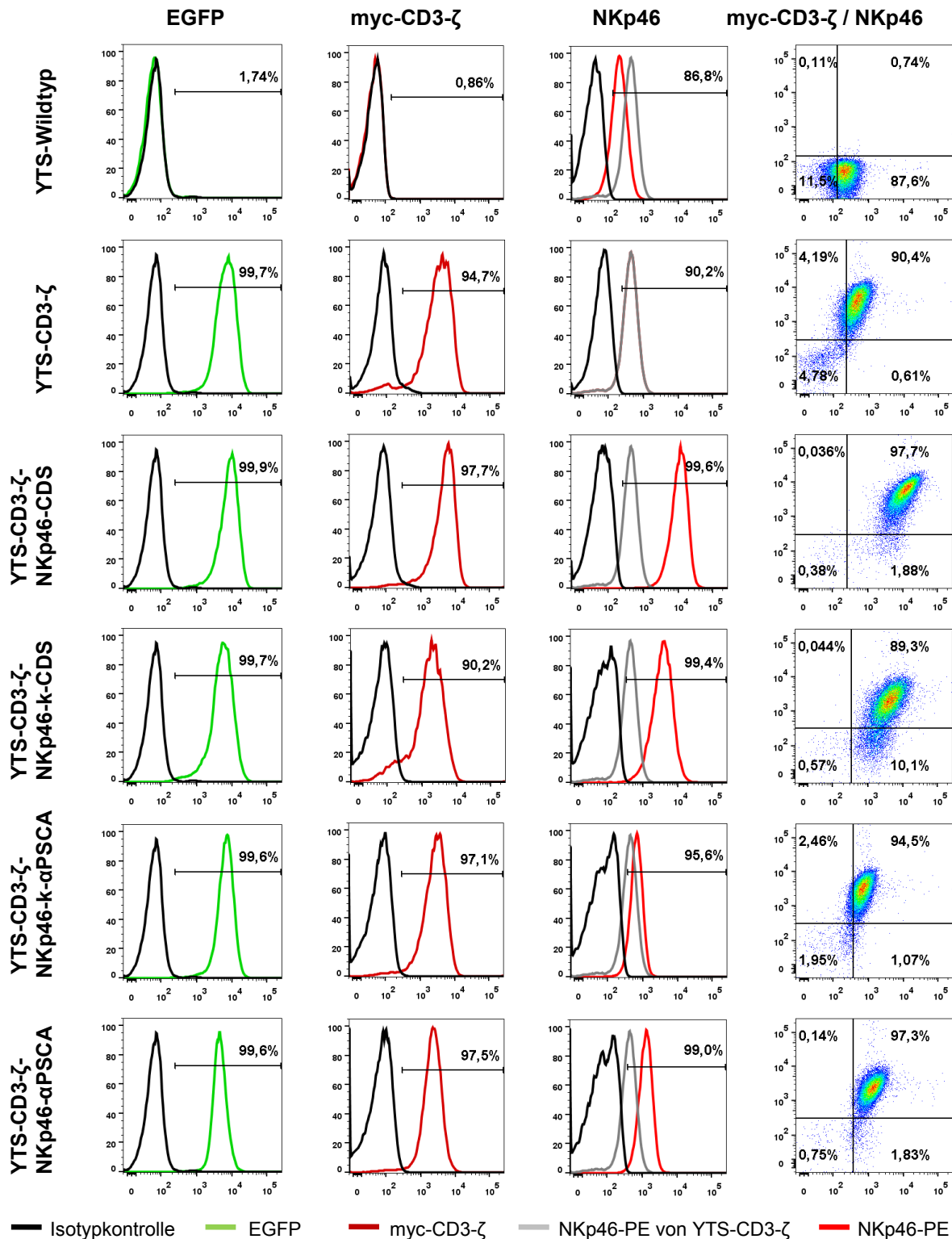


Abbildung 18: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression der CD3- ζ -Kette und des CAR NKp46- α PSCA sowie der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA auf den YTS NK-Zellen. Als weitere Kontrolle wurden YTS Wildtyp-NK-Zellen und YTS-CD3- ζ -Zellen untersucht, da diese endogenes NKp46 exprimieren. Die Färbung der YTS NK-Zellen erfolgte zum einen mit anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-APC (Miltenyi) zum Nachweis der CD3- ζ -Kette und zum anderen mit anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi) zur Detektion von NKp46. Parallel dazu wurde die Expression der CD3- ζ -Kette über das Reporterprotein EGFP ermittelt.

erhöht. Allerdings war sie geringer als bei den YTS-CD3- ζ -Zellen (Abbildung 20, Spur 3), bei denen es zur Überexpression der CD3- ζ -Kette um das 1,7-fache kam. Außerdem erfolgte kein Nachweis der drei phosphorylierten Formen des CD3- ζ -Ketten-Monomers mit den Molekulargewichten von 18 kDa, 21 kDa und 23 kDa, wie bei den YTS-CD3- ζ -Zellen.

3.2.3 Überprüfung des zytotoxischen Potenzials der CAR-armi­erten und CD3- ζ -Kette-exprimierenden YTS NK-Zellen *in vitro*

3.2.3.1 Chrom-Freisetzungssassay

Der Chrom-Freisetzungssassay (2.5.5.1) diente dem Nachweis der spezifische Lyse von PSCA-exprimierenden Tumorzellen durch die mit dem CAR NKp46- α PSCA armierten und die CD3- ζ -Kette-exprimierenden YTS NK-Zellen. Dazu wurden die PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4, die rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA sowie die *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 mit radioaktiven Chrom (^{51}Cr) beladen. Im Anschluss wurden sie für 6 Stunden beziehungsweise 22 Stunden mit dem CAR und der CD3- ζ -Kette koexpri­mierenden YTS NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen von Zielzellen zu Effektorzellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden YTS Wildtyp-NK-Zellen sowie mit den Kontrollkonstrukten CD3- ζ , CD3- ζ -NKp46-CDS, CD3- ζ -NKp46-CDS-k und CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA modifizierte YTS NK-Zellen mitgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lysen, die in drei unabhängigen Versuchen erhoben wurden, sind Abbildung 21 dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

Die spezifische Lyse der PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4 war, wie erwartet, unabhängig von der kokultivierten YTS NK-Zelllinien sehr gering. Sie lag nach 6-stündiger Kokultivierung unter 4 % und nach 22-stündiger Kokultivierung unter 8 % (Abbildung 21a und b). Dagegen wurde bei den PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien eine CAR-vermittelte signifikante ($p < 0,05$) bis sehr signifikante ($p < 0,01$) spezifische Lyse durch die YTS-CD3- ζ -NKp46- α PSCA-Zellen im Vergleich zu den YTS Kontroll-NK-Zellen mit Ausnahme von YTS-CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA nachgewiesen. Die YTS Kontroll-NK-Zellen lysierten mit Ausnahme der RT-4-Zellen unter 10 % der Tumorzellen nach 6 Stunden und 22 Stunden (Abbildung 21a und b). Hingegen lagen die maximalen Lysen, die durch die CAR-armi­erten YTS NK-Zellen vermittelt wurden, abhängig von der Tumorzelllinie nach 6 Stunden (Abbildung 21a) zwischen 29,0 % (HT1376) und 52,8 % (RT-4) und nach 22 Stunden (Abbildung 21b) zwischen 45,7 % (HT1376) und 90,9 % (RT-4).

Dabei wurden diese maximalen Lysen nach 6 Stunden bei einem 1:5-Verhältnis von Zielzellen zu Effektorzellen (Abbildung 21a) und nach 22 Stunden bei einem 1:10-Verhältnis gemessen (Abbildung 21b). Die Kontrollzellen YTS-CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA wiesen ebenfalls eine CAR-vermittelte, zum Teil signifikante, spezifische Lyse der PSCA-exprimierenden Tumorzellen auf. Diese lag nach 6 Stunden (Abbildung 21a) maximal zwischen 9,5 % (HT1376) und 42,8 % (RT-4) und nach 22 Stunden (Abbildung 21b) zwischen 23,8 % (HT1376) und 63,4 % (RT-4) bei einem 1:10-Verhältnis Zielzellen zu Effektorzellen. Sie fiel damit deutlich geringer aus, als die mit dem Vollängenkonstrukt NKp46- α PSCA erzielten spezifischen Lysen.

Zusammenfassend wurde eine starke CAR-vermittelte, signifikante bis sehr signifikante, spezifische Lyse PSCA-exprimierender Tumorzellen durch die Koexpression des CAR NKp46- α PSCA und der CD3- ζ -Kette in YTS NK-Zellen gezeigt.

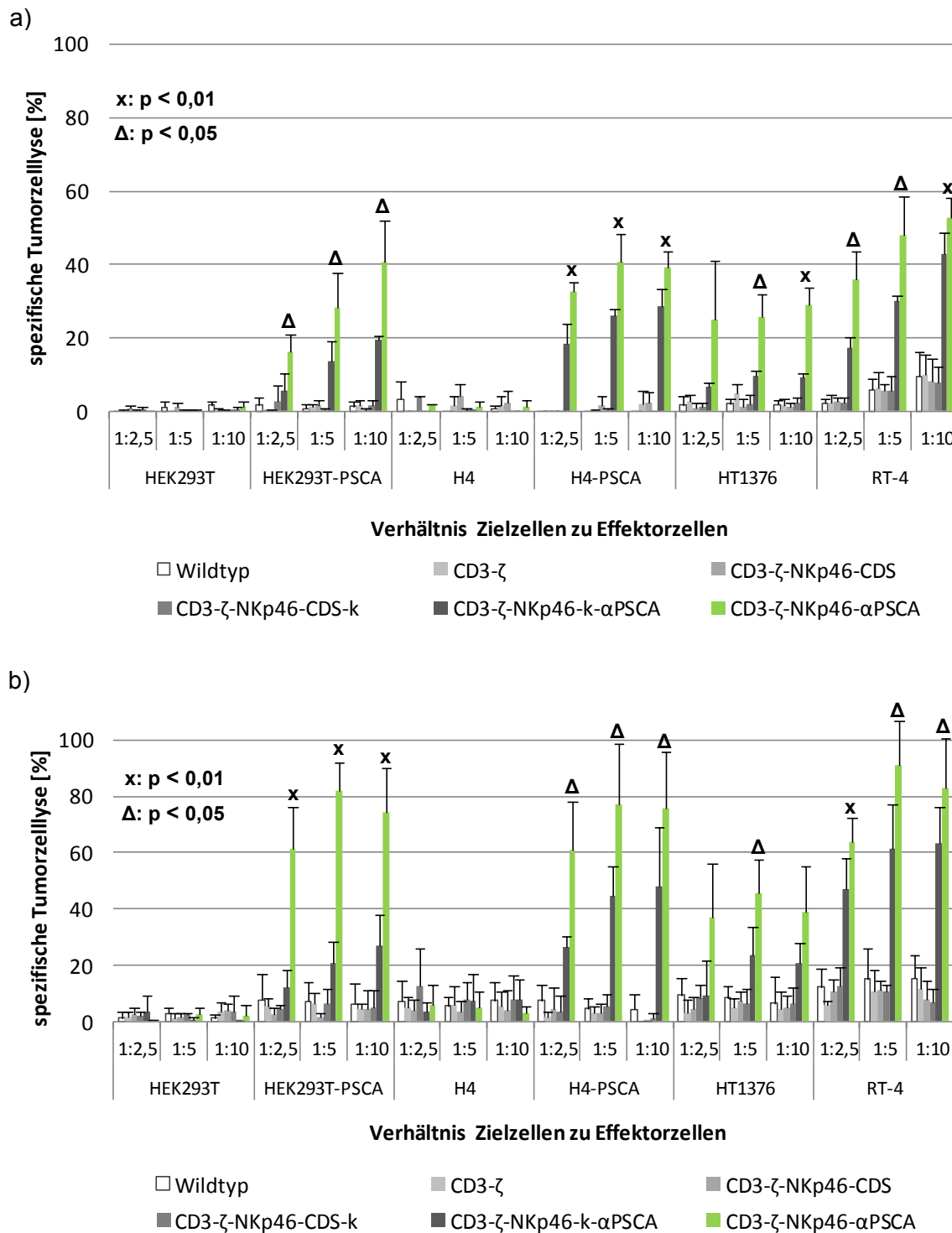


Abbildung 21: Spezifische Zytotoxizität von CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CD3- ζ -überexprimierende und gleichzeitig CAR-armierte YTS NK-Zellen (CD3- ζ -NKp46- α PSCA) sowie YTS Kontroll-NK-Zellen (Wildtyp, CD3- ζ , CD3- ζ -NKp46-CDS, CD3- ζ -NKp46-CDS-k, CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit ^{51}Cr beladenen PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA, H4-PSCA, HT1376, RT-4) und nicht PSCA-exprimierenden (HEK293T, H4) Tumorzelllinien für a) 6 h und b) 22 h kokultiviert. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

In einem weiteren Versuch wurde durch den Einsatz von anti-PSCA-Antikörpern (Tabelle 3) die Bindung des CAR an sein Epitop blockiert, um die CAR-vermittelte Lyse der Tumorzellen durch die YTS NK-Zellen zu bestätigen.

Dazu wurden die YTS NK-Zellen im Vergleich zu primären humanen NK-Zellen zunächst durchflusszytometrisch auf die Expression von CD16 untersucht (Abbildung 22). Bei CD16 handelt es sich um den Fc-Rezeptor FcγRIII, der den Fc-Anteil von IgG-Antikörper, wie dem verwendeten anti-PSCA-Antikörper, bindet und dadurch eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität („Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“, ADCC) der NK-Zellen induziert.

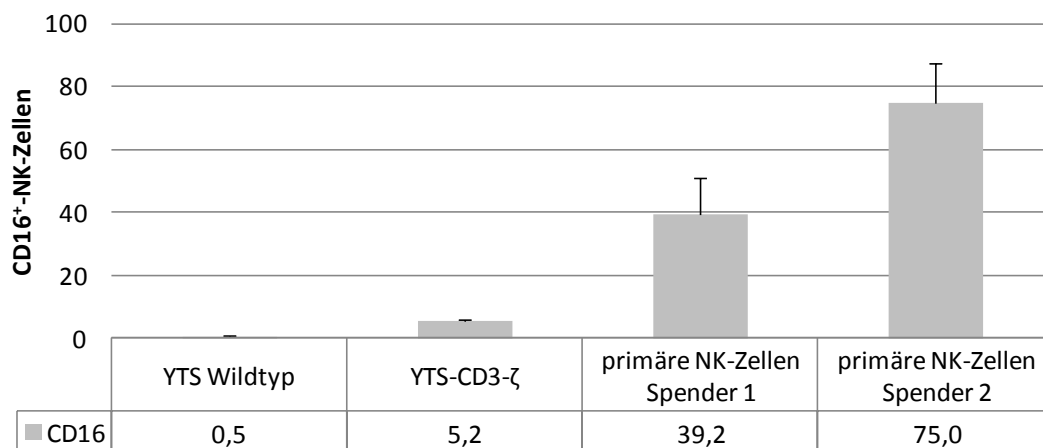


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von YTS und primären humanen NK-Zellen zweier gesunder Spender auf die Expression von CD16. Dargestellt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung dreier unabhängiger Färbungen mit CD16-PE und der entsprechenden Isotypkontrolle von Miltenyi.

CD16 wurde spenderabhängig zu 39,2 % beziehungsweise 75,0 % von primären humanen NK-Zellen exprimiert (Abbildung 24, Säulen 3 und 4). Hingegen war keine Oberflächenexpression von CD16 bei den YTS Wildtyp-NK-Zellen und nur eine sehr geringe (5,2 %) bei den CD3-ζ-Ketten-exprimierenden YTS NK-Zellen (Abbildung 24, Säulen 1 und 2) nachweisbar. Somit konnte der Antikörper anti-PSCA zur Abdeckung von PSCA auf der Tumoroberfläche verwendet werden, da durch die fehlende beziehungsweise geringe CD16-Expression auf den YTS NK-Zellen keine oder nur eine sehr geringe ADCC zu erwarten war, die eine CAR-vermittelte, spezifische Lyse der Tumorzellen hätte verfälschen können.

Die Chrom-Freisetzungssassays wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt, jedoch wurden nur die PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA, H4-PSCA, HT1376 und RT-4 verwendet, da keine Lyse der PSCA-negativen Tumorzelllinien zu erwarten war. Die Abdeckung von PSCA auf der Tumoroberfläche mittels 15 µl anti-PSCA erfolgte während des Beladens der Tumorzellen mit ⁵¹Cr. In Abbildung 23 sind die Mittelwerte und

Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

Wie bei den Chrom-Freisetzungsassays ohne Abdeckung des PSCA auf der Tumoroberfläche (Abbildung 21) zeigten die YTS Kontroll-NK-Zellen mit Ausnahme von YTS-CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA sowohl nach 6 Stunden als auch 22 Stunden eine geringe Lyse von unter 10 % (Abbildung 23a und b, weiße und graue Säulen). Die Kontrollzellen YTS-CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA wiesen trotz Abdeckung des PSCA auf der Tumoroberfläche nach 6 Stunden (Abbildung 23a, dunkelgraue Säulen) eine spezifische Lyse zwischen 9,0 % (HT1376) und 21,5 % (RT-4) und nach 22-stündiger Kokultivierung (Abbildung 23b, dunkelgraue Säulen) zwischen 14,2 % (HT1376) und 36,6 % (RT-4) auf. Diese spezifische Lyse war etwas geringer als die bei den CAR-armierten YTS NK-Zellen YTS-CD3- ζ -NKp46- α PSCA beobachtete. Sie lag nach 6-stündiger Kokultivierung (Abbildung 23a, grüne Säulen) zwischen 15,6 % (HT1376) und 22,3 % (RT-4) und nach 22-stündiger Kokultivierung (Abbildung 23b, grüne Säulen) zwischen 34,5 % (HT1376) und 55,8 % (RT-4).

In Abbildung 24a wurden die spezifischen Lysen durch die CAR NKp46- α PSCA und CD3- ζ -Kette-koexprimierenden YTS NK-Zellen ohne und mit Abdeckung des PSCA auf der Tumoroberfläche vergleichend gegenübergestellt. Dabei wurde deutlich, dass es zu einer starken, zum Teil signifikanten ($p < 0,05$) bis sehr signifikanten ($p < 0,01$) Verringerung der spezifischen Lyse der Tumorzelllinien kam, sobald die Abdeckung des PSCA erfolgte. In Abbildung 24b wurde dies konkretisiert, indem die gegen die spezifischen Lysen ohne Abdeckung des PSCA normalisierten Lysen mit Abdeckung des PSCA dargestellt wurden. Dabei wurde gezeigt, dass die spezifische Lyse mit PSCA-Abdeckung nach 6-stündiger Kokultivierung nur noch zwischen 36 % (RT-4) und 55 % (HEK293T-PSCA) der spezifischen Lyse ohne PSCA-Abdeckung lag (Abbildung 24b). Auch nach 22-stündiger Kokultivierung bewegte sie sich zwischen 32 % (HEK293T-PSCA) und 76 % (HT1376) der spezifischen Lyse ohne PSCA-Abdeckung (Abbildung 24b).

Da es durch die Abdeckung des PSCA auf der Tumorzelloberfläche zu einer deutlichen, zum Teil signifikanten bis sehr signifikanten Verringerung der spezifischen Lyse der Tumorzellen durch die CAR-modifizierten YTS-NK-Zellen kam, wurde so die PSCA-abhängige durch den CAR vermittelte Aktivierung der YTS NK-Zellen bestätigt.

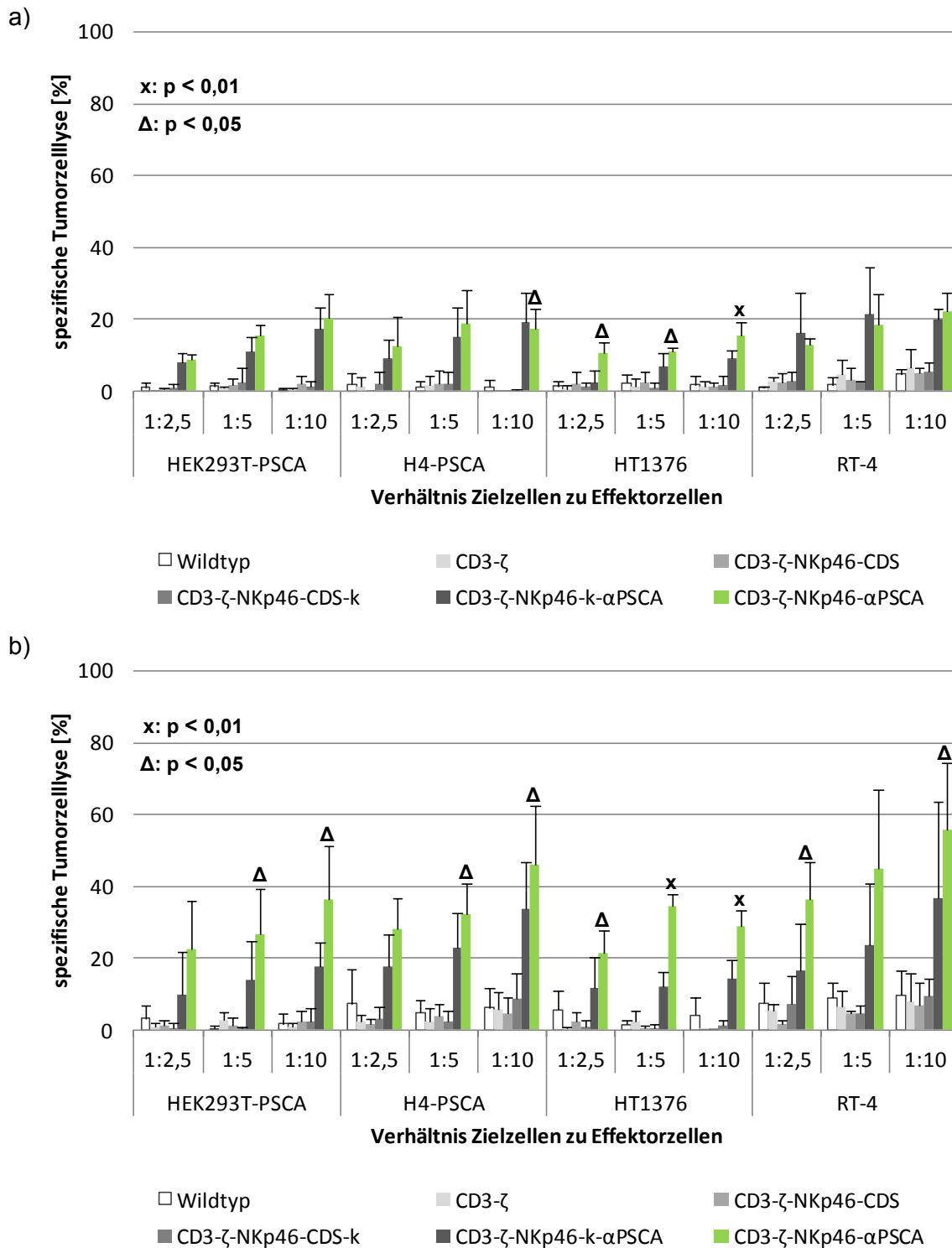


Abbildung 23: Hemmung der spezifischen Zytotoxizität von CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CD3- ζ -überexprimierende und gleichzeitig CAR-armierte YTS NK-Zellen (CD3- ζ -NKp46- α PSCA) sowie YTS Kontroll-NK-Zellen (Wildtyp, CD3- ζ , CD3- ζ -NKp46-CDS, CD3- ζ -NKp46-CDS-k, CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit ^{51}Cr beladenen PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA, H4-PSCA, HT1376, RT-4) Tumorzelllinien für a) 6 h und b) 22 h kokultiviert. Durch den Einsatz von anti-PSCA-Antikörpern war das Epitop für den CAR nicht zugänglich. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

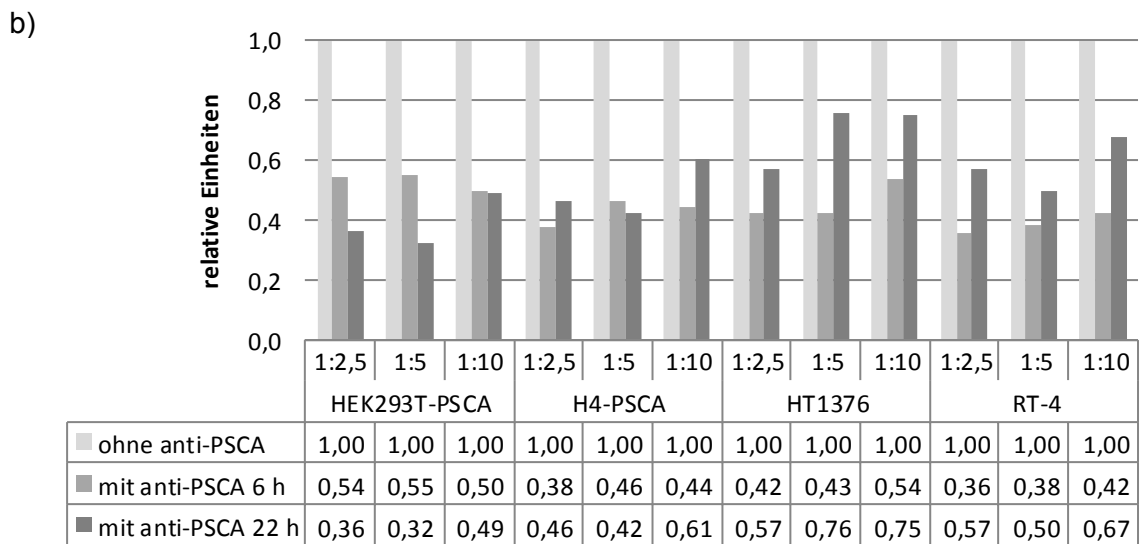
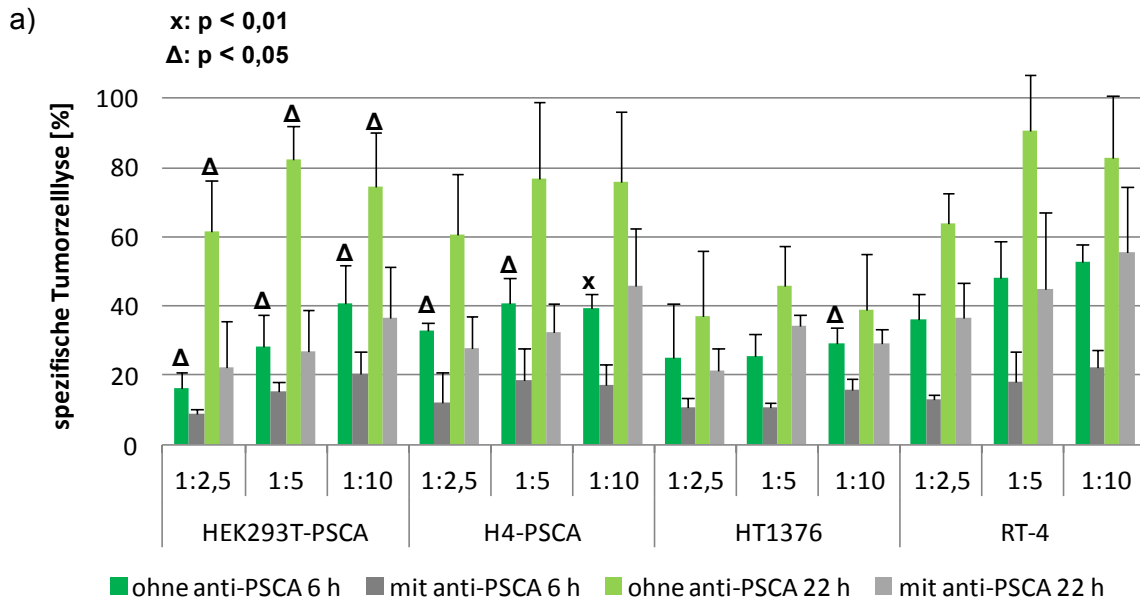


Abbildung 24: Vergleich der spezifischen Zytotoxizitäten der CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen (CD3- ζ -NKp46- α PSCA) gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien ohne und mit Abdeckung des PSCA auf deren Oberfläche mittels anti-PSCA nach Kokultivierung für 6 h und 22 h. a) Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Zytotoxizitäten von drei unabhängigen Versuchen abgebildet. b) Zur besseren Veranschaulichung wurden die gegen die spezifischen Zytotoxizitäten ohne Abdeckung des PSCA normalisierten spezifischen Zytotoxizitäten mit Abdeckung des PSCA auf der Tumeroberfläche dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Student's t-Test berechnet.

3.2.3.2 CD107a als Marker der NK-Zellaktivität

Nach erfolgreichem Nachweis der spezifischen Zytotoxizität CAR-armierter und CD3- ζ -Ketten-überexprimierender YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien (3.2.3.1) wurde die Degranulation, als Wirkmechanismus der Zytotoxizität, untersucht. Dazu wurde die CD107a-Expression auf der Zelloberfläche von NK-Zellen nach der Degranulation durchflusszytometrisch analysiert (2.5.5.3). Sie korreliert mit der Zytokinsekretion und der NK-Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen und ist somit ein Marker für die NK-Zellaktivität nach der Stimulation mit Zielzellen.

CAR NKp46- α PSCA und CD3- ζ -Ketten-koexprimierende YTS NK-Zellen wurden mit den PSCA-negativen Tumorzelllinien HEK293T und H4 sowie den rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA für vier Stunden kokultiviert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse auf CD107a. Als YTS Kontroll-NK-Zellen dienten YTS-Wildtyp, YTS-CD3- ζ und YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS.

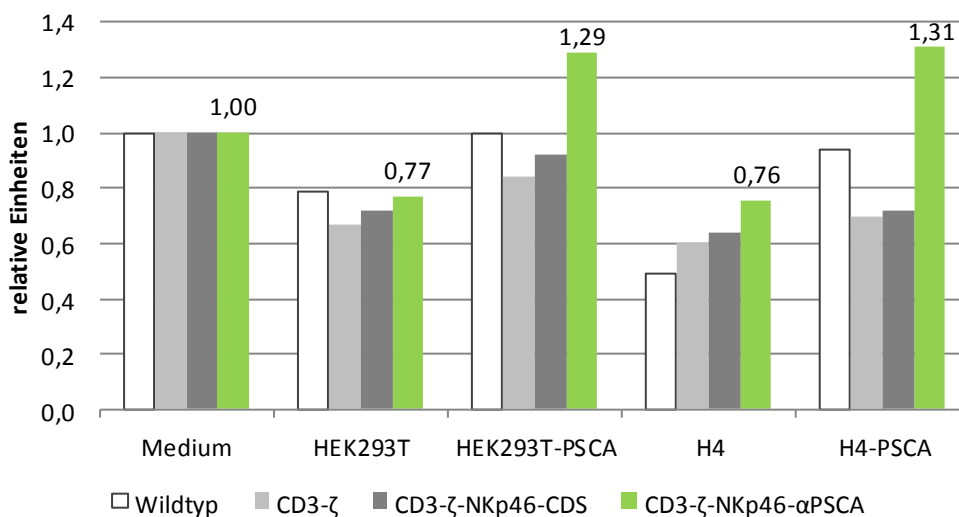


Abbildung 25: Durchflusszytometrischer Nachweis von CD107a auf der Zelloberfläche von CD3- ζ -Ketten- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen (CD3- ζ -NKp46- α PSCA) nach Kokultivierung für 4 h mit rekombinant PSCA-exprimierenden (HEK293T-PSCA und H4-PSCA) und nicht exprimierenden (HEK293T und H4) Tumorzelllinien. Die YTS Kontroll-NK-Zellen Wildtyp, CD3- ζ und CD3- ζ -NKp46-CDS wurden mitgeführt. Die Abbildung zeigt die gegen die Mediumkontrolle, bestehend aus YTS NK-Zellen ohne Zielzellen, normalisierten mittleren Fluoreszenzintensitäten.

In Abbildung 25 wurden repräsentativ aus vier Versuchen die gegen die Mediumkontrolle, bestehend aus YTS NK-Zellen ohne Zielzellen, normalisierten mittleren Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Dabei zeigte sich, dass es bei den PSCA-negativen Tumorzelllinien zu einer verringerten CD107a-Expression auf allen YTS NK-Zelllinien im Vergleich zur Mediumkontrolle kam. Jedoch wurde eine um 29 % (HEK293T-PSCA) bis 31 % (H4-PSCA) gesteigerte CD107a-Expression bei der Kokultivierung PSCA-exprimierender Tu-

morzellen und CAR-armierter YTS NK-Zellen ermittelt (Abbildung 25, 3. und 5. grüne Säule). Da bei den YTS Kontroll-NK-Zellen die CD107a-Expression unter derjenigen der Mediumkontrolle blieb, wurde eine CAR-vermittelte, verstärkte Degranulation und damit CD107a-Expression nachgewiesen. Die CAR-armierten YTS NK-Zellen wurden demnach über das PSCA der Tumorzellen aktiviert.

3.2.3.3 IFN- γ -Freisetzung

Nachdem die spezifische Zytotoxizität (3.2.3.1) und die verstärkte Degranulation (3.2.3.2) der CAR-armierten und CD3- ζ -Ketten-überexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien belegt wurde, erfolgte abschließend die Untersuchung der IFN- γ -Sekretion (2.5.5.2). Dieses zytotoxische Zytokin wird von aktivierten NK-Zellen freigesetzt und dient der Abtötung von Zielzellen. Für diesen Versuch wurden die *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 mit den CAR NKp46- α PSCA armierten und CD3- ζ -Ketten-überexprimierenden YTS NK-Zellen für sechs Stunden kokultiviert. Es wurde dabei ein Verhältnis von 1:5 von Zielzellen zu Effektorzellen genutzt. Als Kontrolle wurden die mit den Kontrollkonstrukten CD3- ζ , CD3- ζ -NKp46-CDS, CD3- ζ -NKp46-CDS-k und CD3- ζ -NKp46-k- α PSCA modifizierten YTS NK-Zellen sowie eine Mediumkontrolle mit YTS NK-Zellen ohne Zielzellen mitgeführt. Die Konzentrationen des in die Zellkulturüberstände sekretierten IFN- γ wurde anschließend mittels des „Human IFN- γ ELISA Sets“ (BD) in einer Doppelbestimmung ermittelt (2.4.1). Repräsentativ aus zwei Versuchen sind die gegen die Mediumkontrolle normalisierten IFN- γ -Konzentrationen in Abbildung 26 dargestellt.

Die IFN- γ -Konzentrationen lagen bei allen YTS Kontroll-NK-Zellen unter denen der Mediumkontrolle (Abbildung 26, weiße und graue Säulen). Bei den CAR-armierten YTS NK-Zellen kam es jedoch zu einem deutlichen Anstieg der IFN- γ -Sekretion um den Faktor 14,35 (HT1376) beziehungsweise 10,87 (RT-4) (Abbildung 26, 2. und 3. grüne Säule). Somit wurde erfolgreich eine CAR-vermittelte IFN- γ -Sekretion nach Kokultivierung mit PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien nachgewiesen.

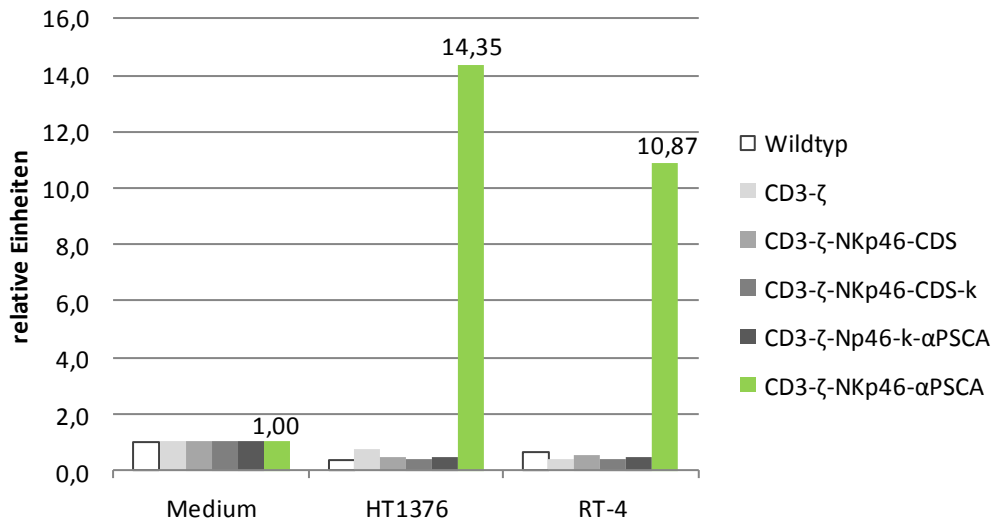


Abbildung 26: IFN- γ -Sekretion der CD3- ζ -Ketten- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber den *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4. CAR-armierte NK-Zellen (NKp46- α PSCA) und Kontroll-NK-Zellen (NKp46-CDS, NKp46-CDS-k, NKp46-k- α PSCA) wurden im Verhältnis 1:5 von Zielzellen zu Effektorzellen mit den beiden Tumorzelllinien für 6 h kokultiviert. Die Konzentration des dabei in die Zellkulturüberstände sekretierten IFN- γ wurde mittels eines ELISA ermittelt. Es wurden die gegen die Mediumkontrolle, bestehend aus YTS NK-Zellen ohne Zielzellen, normalisierten IFN- γ -Konzentrationen dargestellt.

3.3 Der biotinylierbare Rezeptor NKp46-KiBAP

Im Anschluss an den erfolgreichen Nachweis der Funktionalität des chimären Antigenrezeptors (CAR) NKp46- α PSCA erfolgte die Entwicklung eines CAR, dessen Einzelkettenantikörperanteil nicht von der den Rezeptor exprimierenden Zelle synthetisiert wird, sondern erst nach erfolgreicher Rezeptorexpression unter Ausnutzung der sehr starken Biotin-Avidin-Bindung angefügt wird. Der hierfür generierte Rezeptor NKp46-KiBAP besitzt zwei Biotinakzeptorpeptide, die biotinyliert werden können. Dies wiederum ermöglicht die Bindung Avidin-gekoppelter Einzelkettenantikörper, deren Spezifität gegen verschiedene Tumorantigene gerichtet sein kann. So wäre die adjuvante Immuntherapie von unterschiedlichen Tumoren mit Hilfe des universell einsetzbaren Rezeptors NKp46-KiBAP möglich. In dieser Arbeit wurde exemplarisch die Bindung des biotinylierten Einzelkettenantikörpers gegen PSCA (α PSCA-BAP) über Neutravidin an den biotinylierbaren Rezeptor NKp46-KiBAP zur Lyse PSCA-exprimierender Tumorzelllinien untersucht.

3.3.1 Generierung des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP

Der biotinylierbare Rezeptor NKp46-KiBAP besitzt N-terminal zwei Biotinakzeptorpeptide (BAP), das prokaryontische Kimura-BAP und das eukaryontische, humane Propionyl-Coenzym A-Carboxylase-BAP (hPCoAC-BAP). Diese werden durch Glycin-Serin-Linker vom restlichen NKp46 abgetrennt und gehören zu dessen extrazellulärer Domäne. Die verwendete Biotinakzeptorpeptidsequenz des Kimura-BAP wurde von der von Kimura *et al.* (2010) publizierten Sequenz abgeleitet. Diese ist ursprünglich auf die von Schatz (1993) veröffentlichte Konsensussequenz zurückzuführen. Die Biotinakzeptorpeptidsequenz des hPCoAC-BAP ging auf Untersuchungen der Homologien zwischen der Biotinakzeptorsequenz der humane Propionyl-Coenzym A-Carboxylase und der anderen humanen Biotincarboxylasen zurück.

Bei der Klonierung der Expressionsvektoren für den Rezeptor NKp46-KiBAP wurden die beiden lentiviralen Expressionsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP (Tabelle 18) von Dr. Katrin Töpfer (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) als Ausgangsvektoren genutzt. Diese wurden bereits im Kapitel 3.1.1 näher beschrieben.

Zur Generierung des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP wurde zunächst der CAR α PSCA-DAP12 mittels der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI* aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP entfernt. Analog dazu wurde NKp46-KiBAP aus dem Vektor pUC57-NKp46-KiBAP, generiert von Eurofins MWG

Operon, mittels der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *EagI* gewonnen. Durch den Restriktionsverdau mit *EagI* wurde das Stoppcodon von NKp46 deletiert. Da die Restriktionsendonukleaseschnittstelle *NotI* kompatibel zu *EagI* ist, wurde NKp46-KiBAP in die linearisierten Ausgangsvektoren eingefügt. Die entstandenen Vektoren pHATrick-NKp46-KiBAP-Puro^R bzw.-EGFP enthalten den biotinylierbaren Rezeptor, der über die T2A-Schnittstelle von seinem Selektionsmarker abgespalten wird (Abbildung 27). Die detaillierten Vektorkarten und Sequenzen zu dieser Klonierung sind im Anhang zu finden.

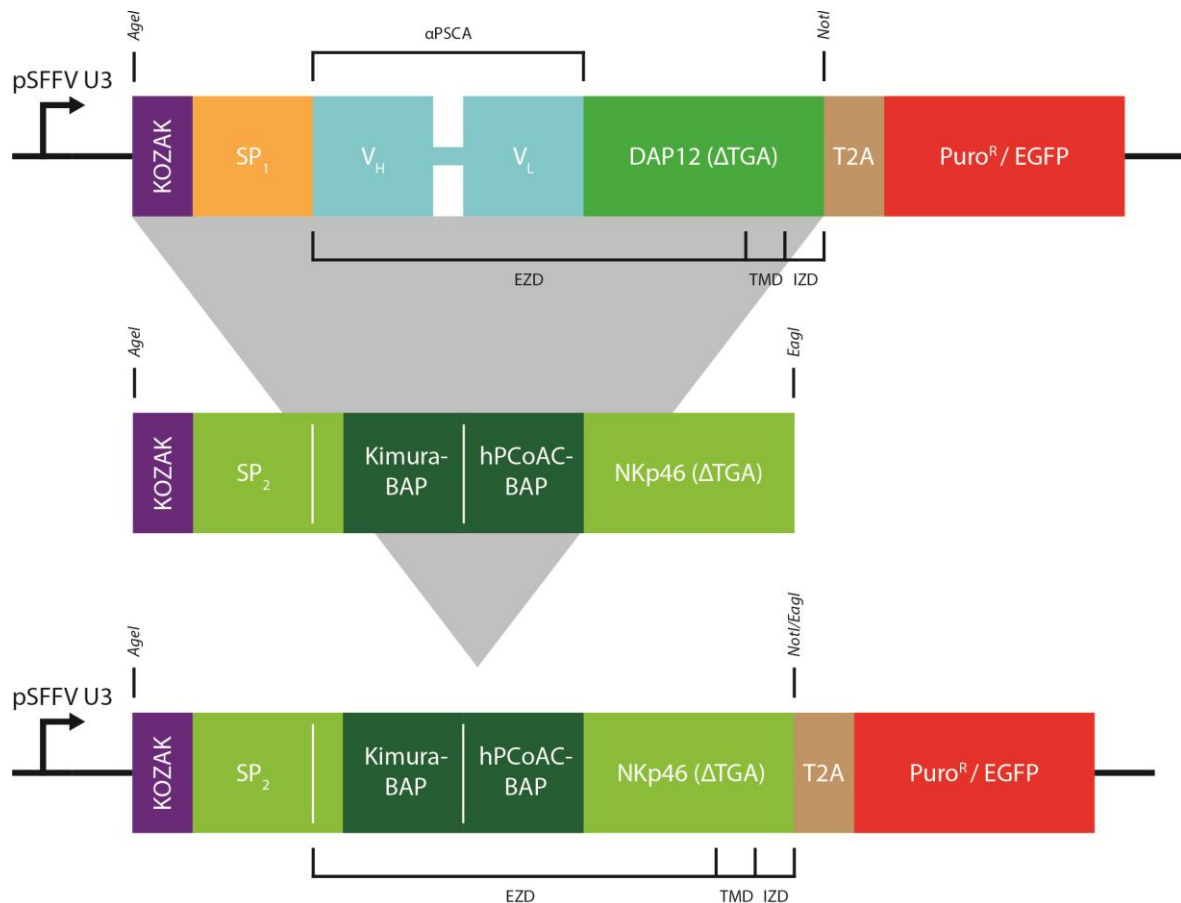


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Klonierung des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP in den lentiviralen Expressionsvektor pHATrick. Nach Entfernung des CAR α PSCA-DAP12 aus den Ausgangsvektoren pHATrick- α PSCA-DAP12-Puro^R und -EGFP mittels der Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI* wurde das aus dem Vektor pUC57-NKp46-KiBAP mittels *AgeI* und *EagI* ausgeschnittene NKp46-KiBAP eingefügt. Durch die Kompatibilität der Restriktionsendonukleaseschnittstellen *NotI* und *EagI* wurden die Vektoren pHATrick-NKp46-KiBAP-Puro^R bzw. -EGFP generiert. Die NKp46-KiBAP-Expression wird durch den Promotor pSFFV U3 reguliert.

(pSFFV U3: U3-Promotor des „Spleen Focus Forming Virus“; SP₁: murines Igk-Signalpeptid; V_H: schwere Kette des Einzelkettenantikörpers; V_L: leichte Kette des Einzelkettenantikörpers; SP₂: Signalpeptid von NKp46; Kimura-BAP: prokaryontisches Biotinakzeptorpeptid; hPCoAC-BAP: eukaryontisches Biotinakzeptorpeptid; NKp46 (Δ TGA): NK-Zellrezeptor NKp46 mit deletiertem Stoppcodon; T2A: proteolytische Spaltstelle des *Thosea asigna Virus*; Puro^R: Puromycinresistenz; EGFP: „Enhanced Green Fluorescent Protein“; EZD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrandomäne; IZD: intrazelluläre Domäne)

3.3.2 Charakterisierung der NKp46-KiBAP-exprimierenden Zelllinien

Die Expression des biotinylierbaren NK-Zellrezeptors NKp46-KiBAP erfolgte mittels des generierten Expressionsvektors pHATrick-NKp46-KiBAP-Puro (3.3.1) sowohl in HEK293T-Zellen als auch in YTS-CD3- ζ -Zellen. Die Nierenkarzinomzelllinie HEK293T wurde zur Überprüfung der Expression und anschließenden Biotinylierung von NKp46-KiBAP mitgeführt, da mit dieser Zelllinie bereits gute Erfahrungen hinsichtlich der Biotinylierung sekretierter Proteine in unserer Arbeitsgruppe durch Stefanie Tietze gemacht wurden. Zunächst wurden lentivirale Partikel mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T hergestellt (2.5.2). Durch die sich anschließende Transduktion der HEK293T-Zellen und YTS-CD3- ζ -Zellen mit den lentiviralen Partikeln wurde der biotinylierbare NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP stabil in das Genom integriert, so dass eine dauerhafte Genexpression gewährleistet wurde (2.5.3.1). Im Anschluss erfolgte eine Selektion mit 20 $\mu\text{g/ml}$ (HEK293T) beziehungsweise 13 $\mu\text{g/ml}$ (YTS NK-Zellen) Puromycin für 48 h, um eine homogene Zellpopulation zu erhalten.

Die Überprüfung der NKp46-KiBAP-Oberflächenexpression erfolgte mittels einer durchflusszytometrischen Analyse (2.5.4). Dazu wurden der Antikörper anti-NKp46-PE und die entsprechende Isotypkontrolle von Miltenyi verwendet.

3.3.2.1 HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro

In Abbildung 28 wird eine repräsentative Färbung aus vier von HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen im Vergleich zu den NKp46-negativen HEK293T-Wildtyp-Zellen gezeigt. Außerdem wurde die Kontrollzelllinie HEK293T-NKp46-CDS-Puro, die den Expressionsvektor pHATrick-NKp46-CDS-Puro (3.1.2) enthält, nach dem oben beschriebenen Schema generiert und anschließend ebenfalls mittels Durchflusszytometrie (2.5.4) untersucht. Dabei wurde die Expression der NK-Zellrezeptoren NKp46-CDS (98,8 %) und NKp46-KiBAP (97,9 %) durch die modifizierten HEK293T-Zellen erfolgreich belegt (Abbildung 28, Histogramm 2 und 3).

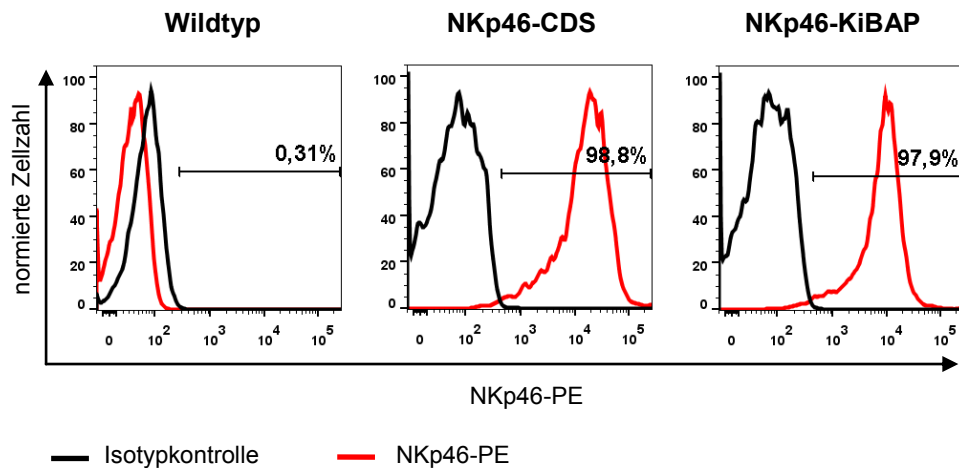


Abbildung 28: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression von NKp46-CDS und NKp46-KiBAP auf HEK293T-Zellen. Die Färbung wurde mit dem Antikörper anti-NKp46-PE (rote Linie) und der entsprechenden Isotypkontrolle (schwarze Linie) von Miltenyi durchgeführt.

3.3.2.2 YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro

Abbildung 29 zeigt eine repräsentative Färbung aus drei der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen im Vergleich zur Ausgangszelllinie YTS-CD3- ζ . Diese sowie die Kontrollzelllinie YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS-Puro wurden bereits unter 3.2.2 näher charakterisiert.

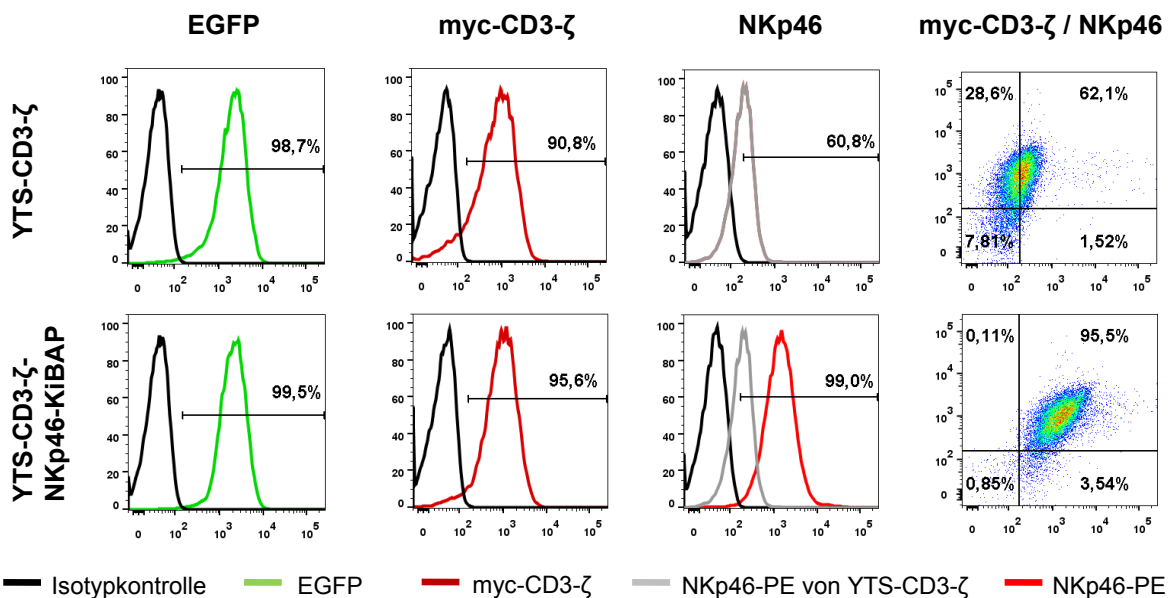


Abbildung 29: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression der CD3- ζ -Kette und des biotinierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP auf den YTS NK-Zellen. Als Kontrolle wurden YTS-CD3- ζ -Zellen untersucht, da diese endogenes NKp46 exprimieren. Die Färbung der YTS NK-Zellen erfolgte zum einen mit anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-APC (Miltenyi) zum Nachweis der CD3- ζ -Kette und zum anderen mit anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi) zur Detektion von NKp46. Parallel dazu wurde die Expression der CD3- ζ -Kette über den Fluoreszenzmarker EGFP ermittelt.

Der Nachweis der CD3- ζ -Kette erfolgte zum einen indirekt über das Reporterprotein EGFP (Abbildung 29, Histogramm 1 und 4). Zum anderen wurde die CD3- ζ -Kette über das myc-Epitop zu über 95,6 % in den YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen detektiert, was etwas mehr als bei den YTS-CD3- ζ -Zellen mit 90,8 % war (Abbildung 29, Histogramm 2 und 5). Ebenso wiesen 99,0 % der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen im Vergleich zu 60,8 % der YTS-CD3- ζ -Zellen NKp46 auf ihrer Oberfläche auf (Abbildung 29, Histogramm 3 und 6). Dies und die wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den endogen NKp46-exprimierenden YTS-CD3- ζ -Zellen ließen darauf schließen, dass es sich dabei um den Rezeptor NKp46-KiBAP handelte. Damit wurde die Koexpression der CD3- ζ -Kette und des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP erfolgreich nachgewiesen.

3.3.3 Exogene Biotinylierung

Die exogene Biotinylierung der Biotinakzeptorpeptide Kimura-BAP und hPCoAC-BAP des NK-Zellrezeptors NKp46-KiBAP erfolgte in Anwesenheit von ATP mittels der exogenen Biotinligase BirA von Avidity. Dies hatte den Vorteil, dass keine endogene Biotinligase in die NK-Zellen transduziert werden musste. Dadurch war zum einen eine schnelle Überprüfung der Biotinylierbarkeit von NKp46-KiBAP möglich. Zum anderen würde sich die exogene Biotinylierung für primäre humane NK-Zellen eignen, da diese nur sehr schlecht kotransduzierbar sind. In den nun folgenden zwei Kapiteln wurden die exogene Biotinylierung und deren Haltbarkeit anhand der HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen untersucht.

3.3.3.1 Exogene Biotinylierung von HEK293T-Zellen und deren Haltbarkeit

Zuerst erfolgte die Untersuchung der exogenen Biotinylierung der HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen in DMEM-Komplettmedium unter Zugabe unterschiedlicher Mengen der exogenen Biotinligase BirA für einen Zeitraum von einer, zwei und 22 Stunden (2.5.6.1). Die zugegebenen BirA-Mengen von 2,5 μ g beziehungsweise 5,0 μ g entsprachen dabei 12500 U beziehungsweise 25000 U Enzym. Am Ende der Inkubationszeit mit der exogenen BirA erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) der Zellen mittels des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi). Als Kontrolle dienten HEK293T-NKp46-CDS-Puro-Zellen, die keine Biotinakzeptorpeptide besaßen. In Abbildung 30 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

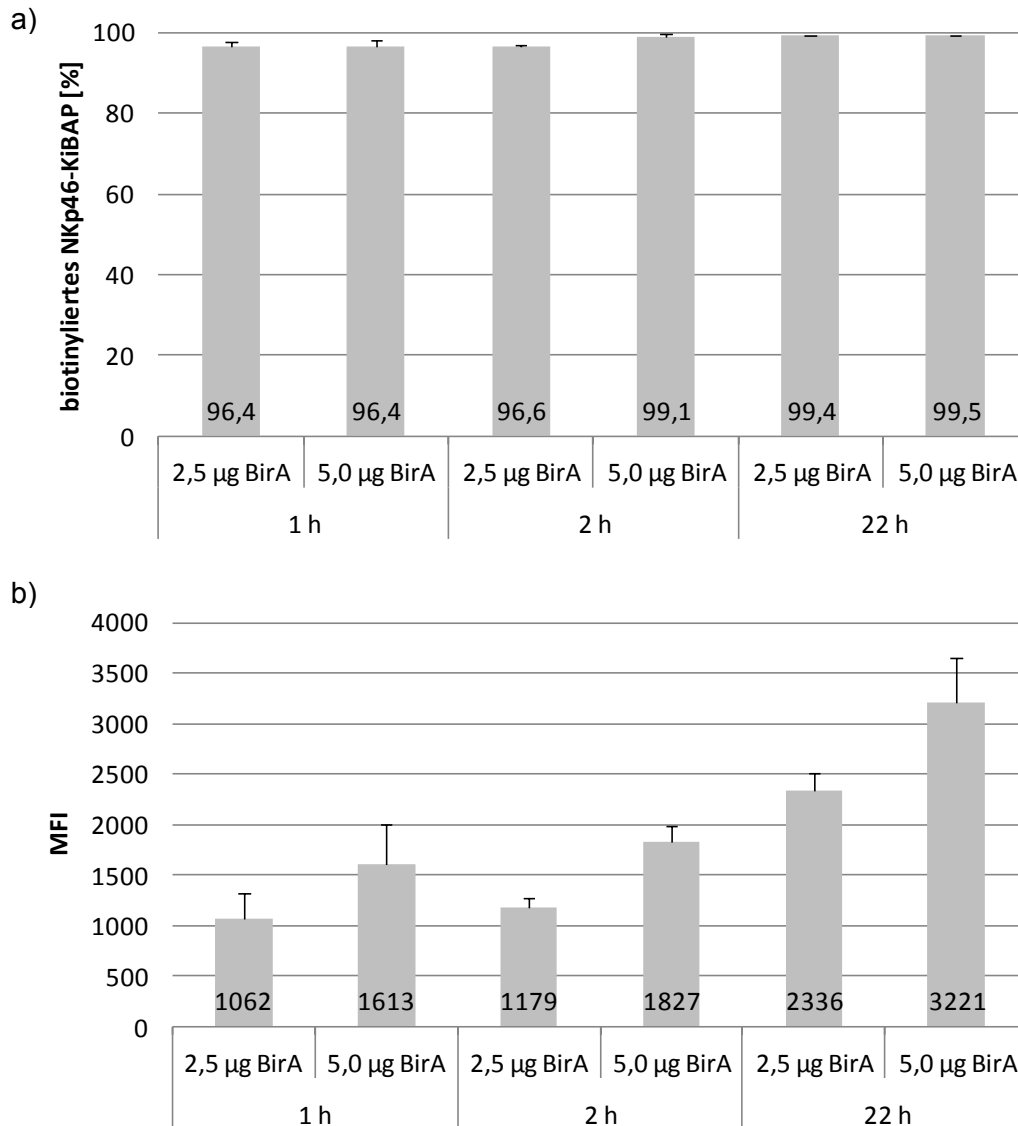


Abbildung 30: Durchflusszytometrischer Nachweis der exogenen Biotinylierung der HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen nach ein-, zwei- und 22-stündiger Inkubation mit 2,5 µg beziehungsweise 5,0 µg BirA in DMEM-Komplettmedium. In a) ist der prozentuale Anteil biotinylierter HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen und in b) sind die dazugehörigen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche.

Die exogene Biotinylierung erfolgte sehr schnell (Abbildung 30a). Schon nach einstündiger Inkubation sowohl mit 2,5 µg als auch 5,0 µg BirA waren 96,4 % der HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen biotinyliert (Abbildung 30a, Säule 1 und 2). Eine leichte Steigerung auf über 99 % wurde durch längere Inkubation bei beiden BirA-Mengen erreicht (Abbildung 30a, Säule 3 - 6). Zur Untersuchung von Unterschieden im Biotinylierungsgrad wurden die entsprechenden mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) herangezogen (Abbildung 30b). Dabei zeigte sich, dass mit der höheren BirA-Menge von 5,0 µg auch ein höherer Biotinylierungsgrad im Vergleich zur BirA-Menge von 2,5 µg über alle Zeiträume erreicht wurde. Jedoch war der Unterschied nach ein- und zweistündiger Inkubation zwischen den MFI-Werten einer BirA-Menge (2,5 µg BirA: 1062 und 1179; 5,0 µg BirA: 1613

und 1827) eher gering. Die exogene BirA blieb auch über einen Zeitraum von 22 Stunden aktiv, da es nochmals zu einem Anstieg der MFI-Werte auf 2336 (2,5 µg BirA) beziehungsweise 3221 (5,0 µg BirA) kam (Abbildung 30b, Säule 5 und 6). Somit wurde erfolgreich die exogene Biotinylierung von NKp46-KiBAP schon nach einstündiger Inkubation mit 2,5 µg exogener BirA in HEK293T-Zellen nachgewiesen.

Im Anschluss wurde die Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung nach Entfernung der BirA aus dem Kultivierungsansatz analysiert (2.5.6.1). Dazu wurden HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen für eine Stunde mit 2,5 µg BirA inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) der Zellen über einen Zeitraum von sieben Stunden nach Entfernung der exogenen BirA. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 31 dargestellt.

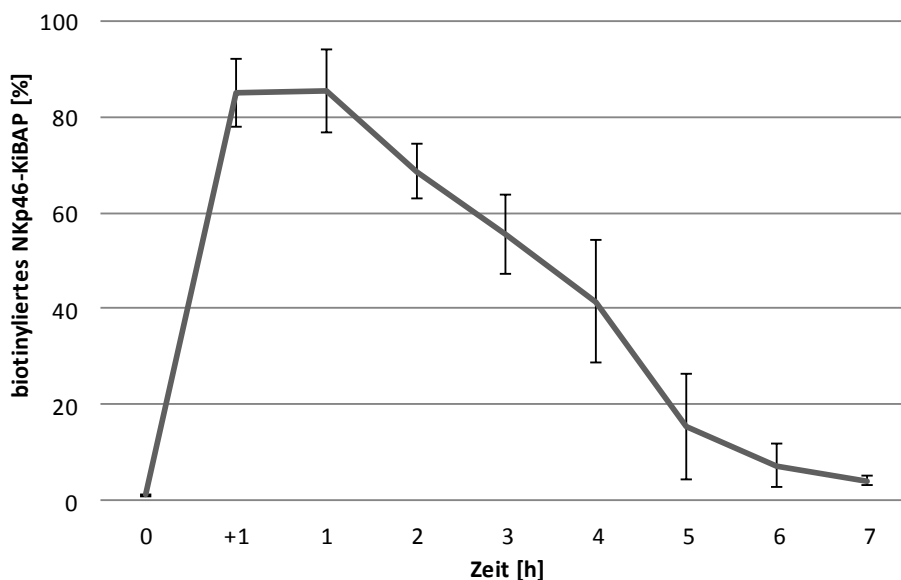


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung von HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 2,5 µg BirA in DMEM-Komplettmedium. Nach Entfernung der exogenen BirA wurde über einen Zeitraum von sieben Stunden mittels anti-Biotin-APC (Miltenyi) der Anteil biotinylierter Zellen ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche.

Nach einstündiger Inkubation mit 2,5 µg BirA stieg der Anteil biotinylierter Zellen von 1 % auf 85,1 % an (Abbildung 31). Eine Stunde nach Entfernung der BirA blieb dieser Prozentsatz erhalten bevor es zu einer stetigen Verringerung des Anteils biotinylierter HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen bis auf nur noch 4 % nach sieben Stunden kam. Die Halbwertszeit lag dabei zwischen drei und vier Stunden nach Entfernung der exogenen BirA. Somit ist die exogene Biotinylierung durch die relativ schnelle Endozytose biotinylierter NKp46-KiBAP-Rezeptoren ohne ständige Inkubation mit der exogenen BirA nur für kurze Versuche geeignet.

3.3.3.2 Exogene Biotinylierung von YTS NK-Zellen und deren Haltbarkeit

Nach erfolgreicher exogener Biotinylierung der HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen mittels der exogenen BirA wurde im folgenden Teil die exogene Biotinylierung der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro untersucht. Dazu wurden die YTS NK-Zellen mit 2,5 μ g BirA über einen Zeitraum von einer halben und einer Stunde sowie anderthalb, zwei und 22 Stunden zunächst in ihrem Standardkomplettmedium RPMI-1640 inkubiert (2.5.6.1). Im Anschluss wurde untersucht, ob die exogene Biotinylierung der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen durch die Inkubation in einem anderen Komplettmedium (DMEM, BME oder α -MEM) als in ihrem Standardkomplettmedium gesteigert werden kann. Der Biotingehalt der Komplettmedien lag laut Herstellerangaben bei 0,2 mg/l (RPMI-1640), 0,0 mg/l (DMEM), 1,0 mg/l (BME) und 0,1 mg/l (α -MEM). So standen zusätzlich zum über den Puffer B zugegebenen Biotin mit einer Konzentration von 50 μ M unterschiedliche Konzentrationen von Biotin aus dem Medium zur Biotinylierung zur Verfügung. Als Kontrollzellen dienten YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS-Puro-Zellen. In Abbildung 32 werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Analyse (2.5.4) mittels anti-Biotin-APC (Miltenyi) von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

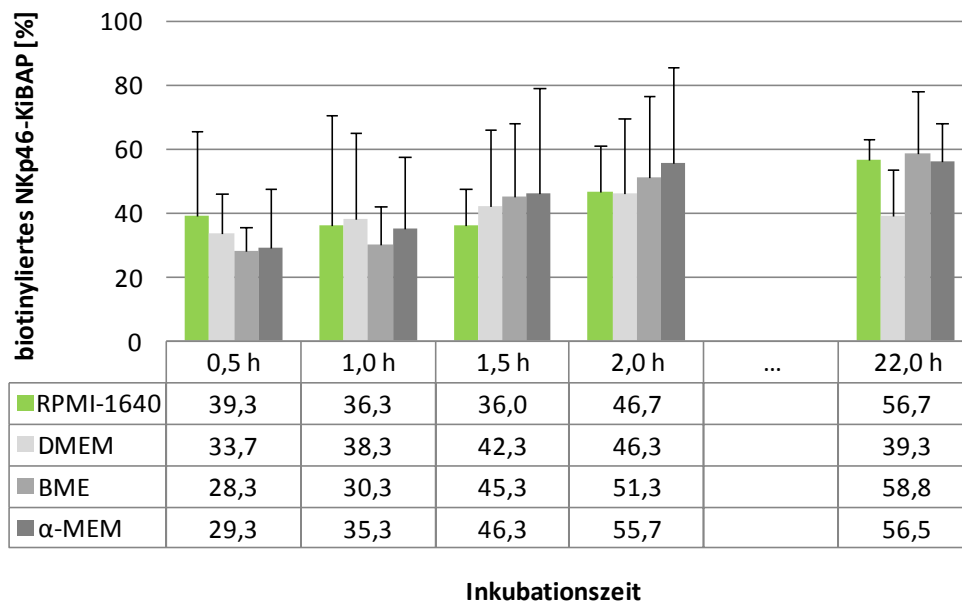


Abbildung 32: Durchflusszytometrischer Nachweis der exogenen Biotinylierung der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit 2,5 μ g exogener BirA. Die Kultivierung erfolgte in den vier Komplettmedien RPMI-1640, DMEM, BME und α -MEM. Zur Färbung der Zellen wurde der Antikörper anti-Biotin-APC (Miltenyi) verwendet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche gezeigt.

Die gemessenen Biotinylierungen schwankten zwischen den einzelnen Versuchen stark, was große Standardabweichungen nach sich zog (Abbildung 32). Zunächst wurde die exogene Biotinylierung im Standardkomplettmedium RPMI-1640 untersucht (Abbildung 32, grüne Säulen). Im Gegensatz zu den HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen (3.3.3.1) lag der Anteil biotinylierter YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen nach einstündiger Inkubation mit der BirA nicht bei 96,4 % sondern nur bei 39,3%. Zwar erhöhte sich der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen nach 2-stündiger Inkubation auf 46,7 % und nach 22-stündiger Inkubation auf 56,7 %, jedoch wurde keine vollständige Biotinylierung, wie bei den HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen (3.3.3.1), erreicht. Aus diesem Grund wurde die exogene Biotinylierung in den Komplettmedien DMEM, BME und α -MEM durchgeführt, um eine eventuell verbesserte Biotinylierungsrate zu erzielen (Abbildung 32, graue Säulen). Je nach Kultivierungsmedium lag der Anteil biotinylierter Zellen nach einer Stunde zwischen 30,3 % (BME) und 38,6 % (DMEM) und damit unter dem Anteil biotinylierter Zellen im Standardkomplettmedium RPMI-1640. Zwar erhöhte sich der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen mit fortschreitender Zeit kontinuierlich (2 h: 46,3 % in DMEM - 55,7 % in α -MEM), jedoch wurden auch nach 22-stündiger Inkubation nur zwischen 39,3 % (DMEM) und 58,8 % (BME) der YTS NK-Zellen biotinyliert. Nach 22-stündiger Inkubation in Komplettmedien BME wurden die besten Ergebnisse erzielt. Allerdings war der Anteil toter YTS NK-Zellen mit 50 - 75 % sehr hoch, da sie nicht an dieses Medium adaptiert waren. Aus diesem Grund wurden die YTS NK-Zellen in weiteren Biotinylierungsversuchen in RPMI-1640 kultiviert, da dort der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen mit 56,7 % nur etwas geringer ausfiel.

Anschließend wurde die Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung nach Entfernung der exogenen BirA analysiert (2.5.6.1). Dazu wurden YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen für eine Stunde mit 2,5 μ g BirA in RPMI-1640 Komplettmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) der Zellen über einen Zeitraum von sieben Stunden nach Entfernung der exogenen BirA. Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen in Abbildung 33 gezeigt.

Durch die Zugabe der exogenen BirA stieg der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen innerhalb einer Stunde von 1 % auf 80 % an (Abbildung 33) und war damit deutlich höher als im vorigen Versuch (Abbildung 32). Als Ursache hierfür wird die Nutzung einer frischen Charge exogener BirA in diesem Versuch vermutet. Nach Entfernung der BirA sank der Prozentsatz biotinylierter YTS NK-Zellen schon innerhalb der ersten Stunde ab und lag nach sieben Stunden nur noch bei 19 %. Die Halbwertszeit der exogenen Biotinylierung wurde dabei circa fünf Stunden nach Entfernung der BirA erreicht.

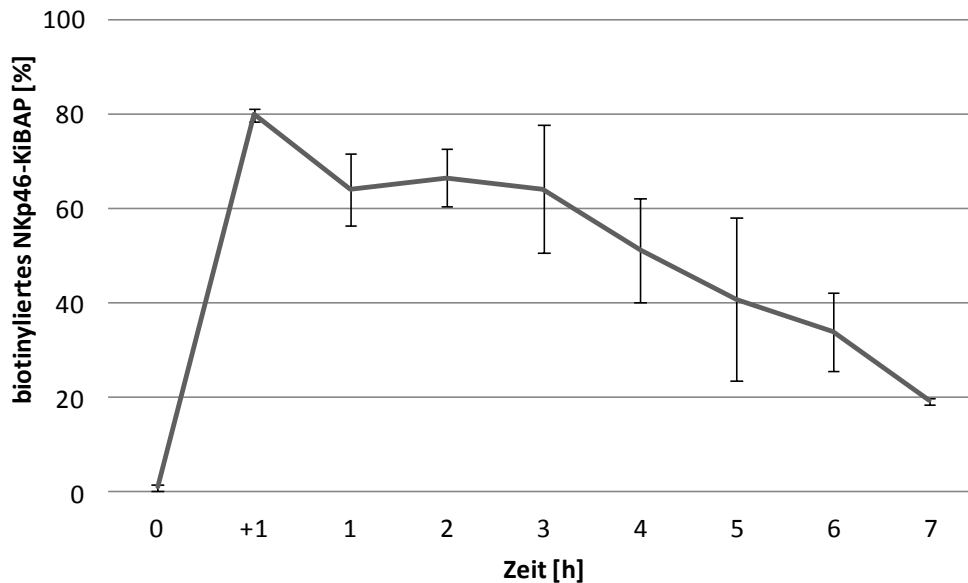


Abbildung 33: Durchflusszytometrische Analyse der Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung von YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen nach einstündiger Inkubation mit 2,5 μ g BirA in RPMI-1640-Komplettmedium. Nach Entfernung der exogenen BirA wurde über einen Zeitraum von sieben Stunden mittels anti-Biotin-APC (Miltenyi) der Anteil biotinylierter Zellen ermittelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche.

Dieser Versuch zeigte die erfolgreiche Biotinylierung von 80 % der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen mit 2,5 μ g BirA innerhalb einer Stunde. Jedoch eignet sich die exogene Biotinylierung durch die relativ schnelle Endozytose der biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptoren ohne ständige Inkubation mit der exogenen BirA nur für kurze Versuche.

3.3.4 Endogene Biotinylierung

Zur endogenen Biotinylierung des NK-Zellrezeptors NKp46-KiBAP war es notwendig durch eine weitere Transduktion eine Biotinligase in die Rezeptor-exprimierenden Zellen einzubringen. In dieser Arbeit handelt es sich dabei um die codonoptimierte, humanisierte Biotinligase HuBirA. Durch deren Expression erfolgte die Biotinylierung der frisch synthetisierten NKp46-KiBAP-Rezeptoren im Zellinneren. Dies hatte gegenüber der exogenen Biotinylierung den Vorteil, dass der NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP bei Vorhandensein von Biotin im Medium immer im biotinylierten Zustand auf der Zelloberfläche vorlag.

3.3.4.1 Generierung von Biotinligase HuBirA und NKp46-KiBAP-koexprimierenden HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen

Zur Expression der Biotinligase in HEK293T-Zellen wurden die von Stefanie Tietze (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmuno-

logie) bereits generierten HEK293T-HuBirA-Zellen verwendet. Deren Generierung erfolgte mittels des retroviralen Expressionsvektors pRev-CMV-HuBirA-Sy, der neben der codonoptimierten, humanisierten Biotinligase HuBirA für eine Hygromycin B-Resistenz kodiert. Die Expression wird durch den sich in 5'-Richtung befindlichen Promotor des Cytomegalievirus (pCMV) reguliert.

Zur Generierung NKp46-CDS- beziehungsweise NKp46-KiBAP-koexprimierender HEK293T-HuBirA-Zellen wurden lentivirale Partikel mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T hergestellt (2.5.2). Die anschließende Transduktion der HEK293T-HuBirA-Zellen mit den lentiviralen Partikeln führte zur stabilen Integration der NK-Zellrezeptoren NKp46-CDS beziehungsweise NKp46-KiBAP in das Genom der Zellen (2.5.3.1), wodurch eine dauerhafte Genexpression erfolgte. Im Anschluss wurden die generierten HEK293T-HuBirA-NKp46-CDS-Puro- und HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen mit 20 µg/ml Puromycin für 48 h selektiert, um eine homogene Zellpopulation zu erhalten.

Die Expression der Biotinligase in den YTS NK-Zellen erfolgte durch den von Stefanie Tietze (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) generierten lentiviralen Expressionsvektor pHATrick-HuBirA-Sy-Puro. Dieser kodiert für die codonoptimierte, humanisierte Biotinligase HuBirA, deren Expression durch den in 5'-Richtung sich befindlichen U3-Promotor des „*Spleen Focus Forming Virus*“ (pSFFV U3) reguliert wird. Vor dem offenen HuBirA-Leserahmen wurde eine KOZAK-Sequenz eingefügt, die als eukaryontische Ribosomenbindungsstelle eine verbesserte HuBirA-Expression gewährleistet (Kozak, 1991). An die KOZAK-Sequenz schloss sich der erste Bestandteil des HuBirA-Leserahmens, das murine Igκ-Signalpeptid, an. Es dient dem Zugang des HuBirA zum sekretorischen Signalweg. Das sich C-terminal an die HuBirA anschließende VSV-G-Epitop erlaubt deren Nachweis. Die nachfolgende T2A-Schnittstelle, ein 2A-Peptidkonsensusmotiv des *Thosea asigna Virus*, ermöglicht die proteolytische Spaltung der HuBirA vom Puromycin-Selektionsmarker.

Zur Generierung HuBirA-exprimierender YTS NK-Zellen wurden lentivirale Partikel mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T hergestellt (2.5.2). Durch die sich anschließende Transduktion der YTS NK-Zellen wurde die humanisierte Biotinligase HuBirA stabil in das Genom integriert, so dass eine dauerhafte Genexpression gewährleistet wurde (2.5.3.1). Im Anschluss erfolgte eine Selektion mit 13 µg/ml Puromycin für 48 h, um eine homogene YTS NK-Zellpopulation zu erhalten. Nach der erfolgreichen Generierung der YTS-HuBirA-Zellen wurden nach oben beschriebenen Schema lentivirale Partikel von den Expressionsvektoren NKp46-CDS-EGFP und NKp46-KiBAP-EGFP (3.1.2 und 3.3.1) hergestellt und damit die YTS-HuBirA-Zellen transduziert. Dabei entstanden die Kontrollzelllinie YTS-HuBirA-NKp46-CDS-EGFP und die den biotinylbaren Rezeptor NKp46-KiBAP-exprimierende Zelllinie YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-EGFP.

3.3.4.2 Charakterisierung der Biotinligase HuBirA-exprimierenden HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen

Der Nachweis der HuBirA in den HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen erfolgte über eine Western Blot-Analyse. Dazu wurden Totalzelllysate von diesen Zellen hergestellt (2.4.2). Nach der Proteinbestimmung (2.4.4) wurden jeweils 50 µg Protein mittels SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (2.4.5). Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Proteine mit Hilfe des Western Blots auf eine PVDF-Membran (2.4.6). Nachfolgend wurde die HuBirA über ihr VSV-G-Epitop mittels des Antikörpers anti-VSV-G (Santa Cruz) nachgewiesen (2.4.7). Als Kontrolle für einen gleichmäßigen Proteinauftrag fungierte das Protein α -Tubulin, das nach „Stripping“ der Membran (2.4.8) mittels des Antikörpers anti- α -Tubulin (Santa Cruz) detektiert wurde. Die Stärke der Proteinbanden wurde im Anschluss densitometrisch mit ImageJ ausgewertet. Dabei wurde die Stärke der YTS-HuBirA-Bande in Relation zur Stärke der HEK293T-HuBirA-Bande gesetzt.

In Abbildung 34 wird die Expression der HuBirA in den YTS NK-Zellen (Spur 2) und HEK293T-Zellen (Spur 3) dargestellt. Als Negativkontrolle wurden YTS Wildtyp-NK-Zellen (Spur 1) mitgeführt. Die HuBirA mit ihrem Molekulargewicht von 36,5 kDa wurde sowohl bei den YTS-HuBirA-Zellen als auch den HEK293T-HuBirA-Zellen erfolgreich detektiert. Jedoch war das Expressionsniveau in den HEK293T-HuBirA-Zellen um das 6,5-fache höher. Des Weiteren hatte die von den YTS NK-Zellen exprimierte HuBirA ein leicht höheres Molekulargewicht als die von den HEK293T-Zellen exprimierte HuBirA.

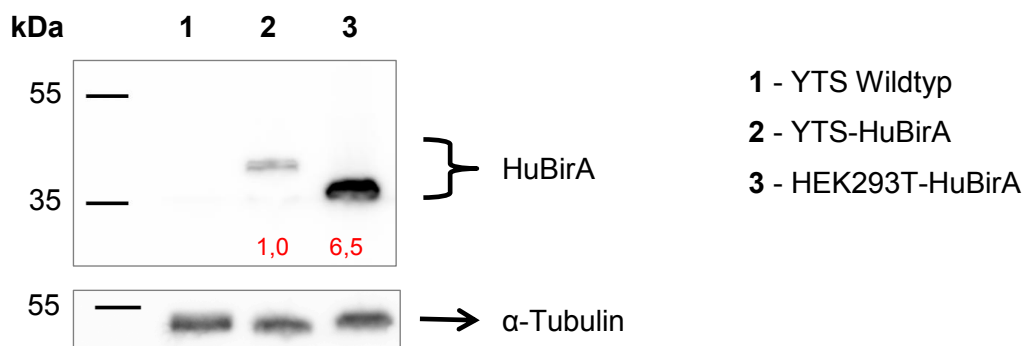


Abbildung 34: Nachweis der Biotinligase HuBirA in HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen mittels Western Blot-Analyse. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper anti-VSV-G und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der gleichmäßige Proteinauftrag wurde mittels des Antikörpers anti- α -Tubulin überprüft. Die rot dargestellten Zahlen entsprechen den densitometrisch-ermittelten, α -Tubulin-normierten HuBirA-Expressionsniveaus.

Die NKp46-KiBAP-Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (2.5.4) ermittelt. Eine repräsentative Analyse aus drei ist in Abbildung 35 dargestellt. Dazu wurden bei den HEK293T-Zellen der Antikörper anti-NKp46-PE und die entsprechende Isotypkontrolle von Miltenyi verwendet. Der Nachweis von NKp46-CDS beziehungsweise NKp46-KiBAP erfolgte bei den schon endogen NKp46-exprimierenden YTS NK-Zellen über den Fluoreszenzmarker EGFP. Es wurde dabei erfolgreich die Expression des NKp46-KiBAP-Konstrukts und des Kontrollkonstrukts NKp46-CDS in über 91 % der HEK293T- und YTS-HuBirA-Zellen nachgewiesen (Abbildung 35).

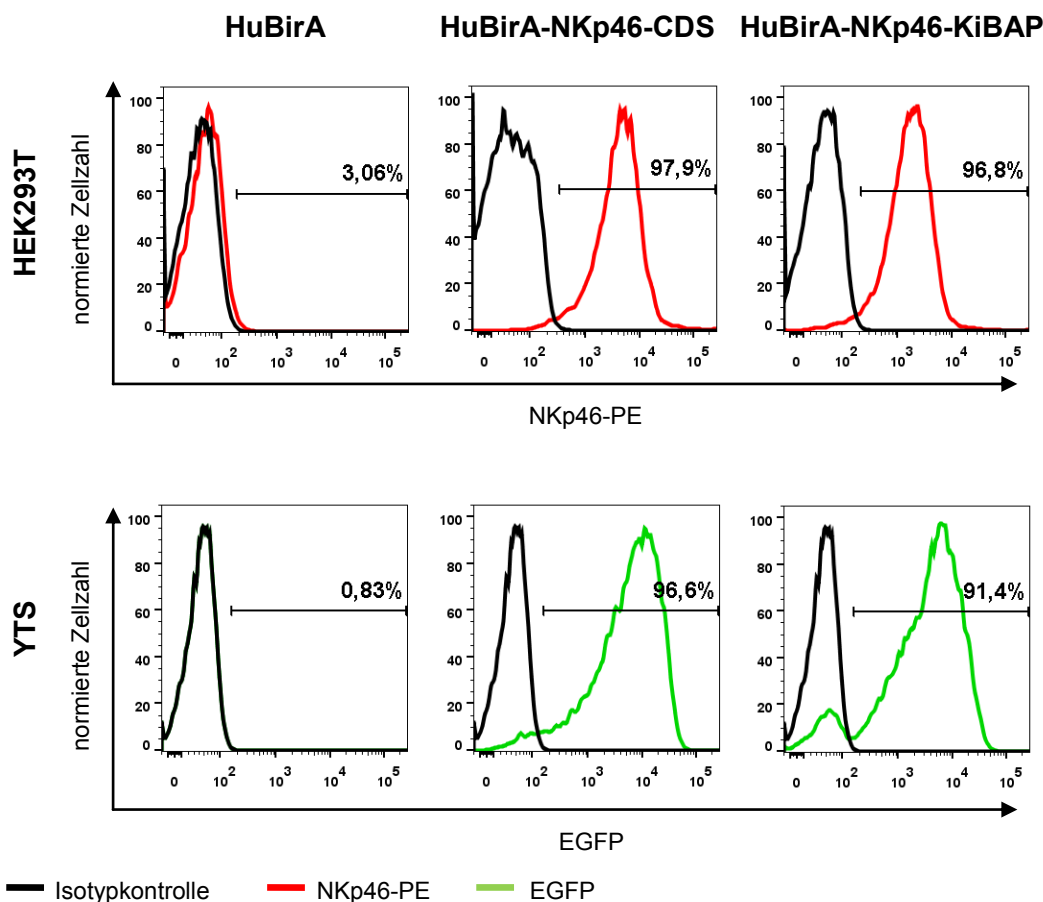


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von NKp46-KiBAP und NKp46-CDS auf den HEK293T- und YTS-HuBirA-Zellen. Die Färbung der HEK293T-HuBirA-Zellen erfolgte mit anti-NKp46-PE (Miltenyi) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi). Bei den YTS-HuBirA-Zellen wurde die Expression über den Fluoreszenzmarker EGFP ermittelt.

3.3.4.3 Endogene Biotinylierung von HEK293T-Zellen

Die endogene Biotinylierung der generierten HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen erfolgte in DMEM-Komplettmedium ohne oder mit zusätzlicher Gabe von 50 μ M Biotin für 24 Stunden (2.5.6.2). Als Negativkontrolle wurden HEK293T-HuBirA-NKp46-CDS-Zellen und als Positivkontrolle HEK293T-HuBirA-DAP12-CD94-NKG2C-KiBAP-Zellen, die unter meiner Betreuung durch Kristin Freudenberg generiert worden waren, mitgeführt. In Ab-

Abbildung 36 ist die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) mit Hilfe des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

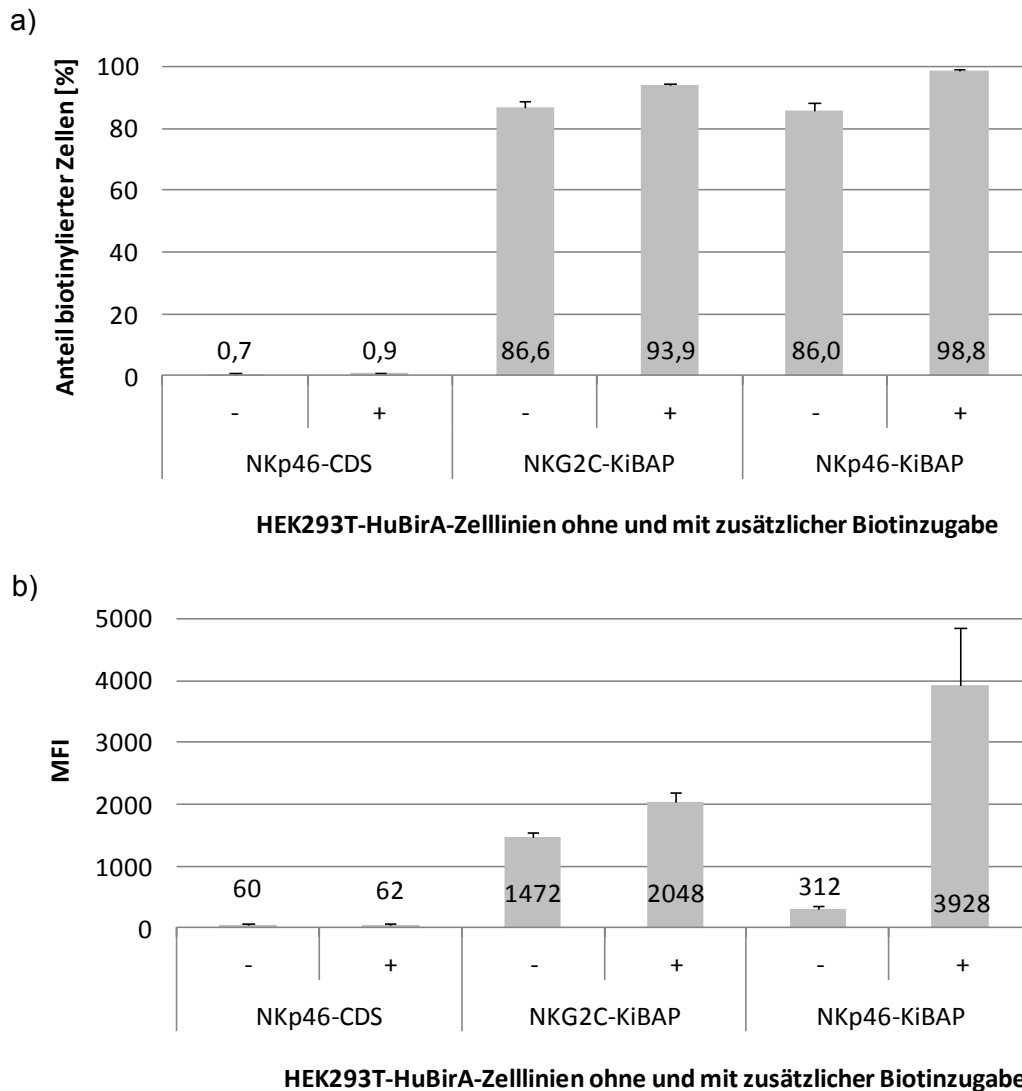


Abbildung 36: Durchflusszytometrischer Nachweis der endogenen Biotinylierung der HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro nach 24-stündiger Kultivierung in DMEM-Komplettmedium ohne oder mit Zugabe von 50 μ M Biotin. Als Kontrollkonstrukte fungierten NKp46-CDS- und NKG2C-KiBAP-exprimierende HEK293T-HuBirA-Zellen. In a) ist der prozentuale Anteil biotinylierter HEK293T-HuBirA-Zellen und in b) sind die dazugehörigen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche.

Wie erwartet, zeigten die NKp46-CDS-exprimierenden HEK293T-HuBirA-Zellen unabhängig von der Biotinzugabe keinerlei Biotinylierung (Abbildung 36a, Säule 1 und 2). Die als Positivkontrolle fungierenden NKG2C-KiBAP-exprimierenden HEK293T-HuBirA-Zellen wurden zu 86,6 % biotinyliert, wobei dieser Prozentsatz durch die Gabe von 50 μ M Biotin auf 93,9 % erhöht wurde (Abbildung 36a, Säule 3 und 4). Dabei stammte das im DMEM-Komplettmedium *per se* enthaltene Biotin vom hinzugefügten FKS. Ähnliche Werte wurden mit den NKp46-KiBAP-exprimierenden HEK293T-HuBirA-Zellen erzielt. Bei diesen

Zellen lag der Anteil an biotinylierten Zellen bei 86,0 % ohne und sogar bei 98,8 % mit Biotinzugabe (Abbildung 36a, Säule 5 und 6). Diese Steigerung der Biotinylierung durch die zusätzliche Gabe von Biotin wurde durch den Vergleich der entsprechenden mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) verdeutlicht (Abbildung 36b). Die MFI betrug für die NKp46-KiBAP-exprimierenden Zellen ohne Biotinzugabe 312 und verzehnfachte sich auf 3928 bei Zugabe von 50 μM Biotin (Abbildung 36b, Säule 5 und 6). Somit wurde erfolgreich die endogene Biotinylierung der HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen nachgewiesen, wobei eine zusätzliche Gabe von 50 μM Biotin zum Medium diese deutlich verbesserte.

3.3.4.4 Endogene Biotinylierung von YTS NK-Zellen

Die endogene Biotinylierung der generierten YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen wurde im Zeitraum von null bis fünf Stunden und nach 22 Stunden untersucht (2.5.6.2). Dabei erfolgte die Kultivierung neben dem Standardkomplettmedium RPMI-1640 auch in DMEM-Komplettmedium, wobei entweder kein oder 50 μM Biotin zugesetzt wurden. Im letzteren Fall wurden wiederum entweder selbst zu lösendes Biotin von Sigma oder schon fertig gelöstes Biotin von Avidity verwendet. Als Negativkontrolle fungierten YTS-HuBirA-NKp46-CDS-Zellen. In Abbildung 37 ist die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) mit Hilfe des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Die endogene Biotinylierung lag vor Beginn des Versuchs bei 36 % (Abbildung 37). Nach Umsetzen der NKp46-KiBAP-exprimierenden YTS-HuBirA-Zellen in frisches RPMI-Komplettmedium ohne zusätzliche Biotinzugabe schwankte der Anteil biotinylierter Zellen innerhalb der nächsten fünf Stunden leicht zwischen 36 % und 42 %. Auch nach 22 Stunden kam es zu einer leichten Erhöhung des Prozentsatzes biotinylierter Zellen (49 %). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Kultivierung im DMEM Komplettmedium erzielt, um den Einfluss des Mediums auf die endogene Biotinylierung zu untersuchen. Dabei lag der Anteil biotinylierter, NKp46-exprimierender YTS-HuBirA-Zellen in den ersten fünf Stunden der Kultivierung ebenfalls zwischen 36 % und 42 %. Nach 22-stündiger Kultivierung wurde ein Anteil von 40 % biotinylierte YTS NK-Zellen ermittelt. Durch die Zugabe von 50 μM Biotin, sowohl des selbst gelösten von Sigma als auch des fertig gelösten von Avidity, kam es unabhängig vom verwendeten Kultivierungsmedium zu einem rapiden Absinken des Anteils biotinylierter YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen von 36 % auf unter 5 % innerhalb einer Stunde. Diese geringen Prozentsätze wurden über den gesamten verbleibenden Versuchszeitraum gemessen. Auch bei einer höheren Biotinzugabe von 100 μM waren nur noch unter 5 % der YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zellen nach 22-stündiger Kultivierung in DMEM- oder RPMI-1640-Komplettmedium biotinyliert (Daten nicht gezeigt). Je-

doch erfolgte ohne zusätzliche Biotinzugabe die endogene Biotinylierung jeder zweiten YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-Zelle im Standardkomplettmedium RPMI-1640.

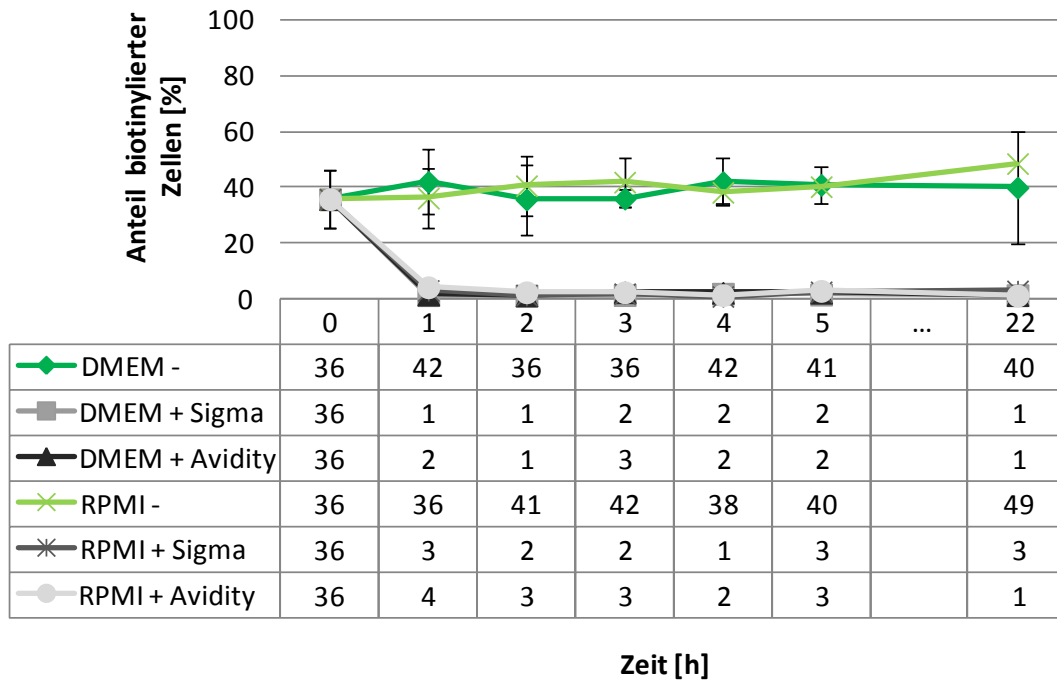


Abbildung 37: Durchflusszytometrischer Nachweis der endogenen Biotinylierung der YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-EGFP-Zellen nach null bis 5-stündiger sowie 22-stündiger Kultivierung in DMEM- und RPMI-1640-Komplettmedium ohne oder mit Zugabe von 50 μM Biotin (selbst gelöst von Sigma oder fertig gelöst von Avidity). Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper anti-Biotin-APC. Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche dargestellt.

3.3.4.5 Bindung des Einzelkettenantikörpers $\alpha\text{PSCA-BAP}$ an PSCA und NKp46-KiBAP

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl die exogene als auch endogene Biotinylierung des NK-Zellrezeptors NKp46-KiBAP in YTS NK-Zellen möglich war, wurde im nächsten Schritt der biotinylierte Einzelkettenantikörper gegen PSCA ($\alpha\text{PSCA-BAP}$, 2.1.2) an den NKp46-KiBAP-Rezeptor gebunden. Dieser Antikörper wurde mir freundlicherweise von Stefanie Tietze (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, AG Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die Spezifität gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen und der Biotinylierungsgrad des biotinylierten Einzelkettenantikörpers $\alpha\text{PSCA-BAP}$ überprüft (2.5.6.3). Dazu wurde $\alpha\text{PSCA-BAP}$ mit den PSCA-exprimierenden HEK293T-PSCA-Zellen für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4). Dabei wurde $\alpha\text{PSCA-BAP}$ auf der Tumorzelloberfläche über sein myc-Epitop mittels des Antikörpers anti-c-myc-FITC (Miltenyi) detektiert. Der Biotinylierungsgrad wurde mit Hilfe des Antikörpers anti-Biotin-APC (Miltenyi) ermittelt. Eine repräsentative Fär-

bung aus drei wird in Abbildung 38 gezeigt. Dabei wurde erfolgreich eine 100%ige Bindung des zu 100 % biotinylierten Einzelkettenantikörpers α PSCA-BAP an die PSCA-exprimierenden HEK293T-PSCA-Zellen nachgewiesen.

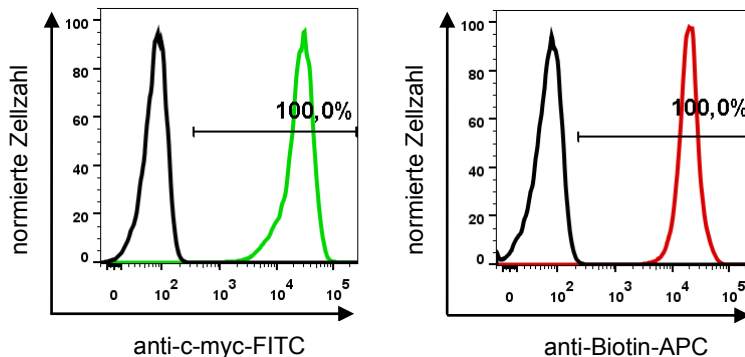


Abbildung 38: Durchflusszytometrischer Nachweis der Spezifität des Einzelkettenantikörpers α PSCA-BAP gegenüber PSCA-exprimierenden HEK293T-PSCA-Tumorzellen durch dessen Detektion auf der Zelloberfläche über anti-c-myc-FITC. Des Weiteren wurde der Biotinylierungsgrad des biotinylierten α PSCA-BAP mittels des Antikörpers anti-Biotin-APC bestimmt.

Im Anschluss wurde der biotinylierte Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP über Neutravidin an den biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptor der YTS NK-Zellen gebunden, um somit einen vollständigen CAR-Rezeptor zu erhalten. Dazu wurde zunächst das biotinylierte α PSCA-BAP mit Neutravidin gekoppelt (2.5.6.3), wobei Ansätze mit Proteinmengen von 1 μ g, 2,5 μ g, 5 μ g und 10 μ g biotinyliertem α PSCA-BAP Verwendung fanden. Anschließend wurden die endogen biotinylierten YTS-HuBirA-Puro-NKp46-KiBAP-EGFP-Zellen beziehungsweise exogen biotinylierten YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen mit den verschiedenen Ansätzen von α PSCA-BAP-Neutravidin für eine Stunde inkubiert. Als Kontrollzellen dienten YTS-HuBirA-Puro-NKp46-CDS-EGFP-Zellen beziehungsweise YTS-CD3- ζ -NKp46-CDS-EGFP-Zellen. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (2.5.4) mittels der Antikörper anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-APC beziehungsweise anti-His-PE von Miltenyi zur Oberflächendetektion des über Neutravidin an den biotinylierten NKp46-KiBAP-Rezeptor gebundenen α PSCA-BAP. Dabei wurden das myc-Epitop beziehungsweise das His-Epitop von α PSCA-BAP für dessen Detektion genutzt. Da nur YTS NK-Zellen mit dem biotinylierten Rezeptor NKp46-KiBAP den Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP über Neutravidin binden konnten, wurde im Anschluss der Anteil α PSCA-BAP-positiver Zellen nur auf diese Zellpopulation bezogen. In Abbildung 39 sind von den erhaltenen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen dargestellt.

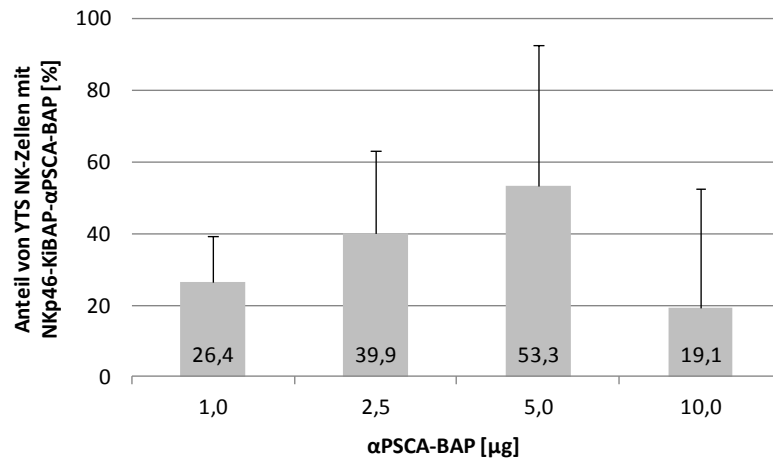


Abbildung 39: Prozentualer Anteil von YTS NK-Zellen, die den kompletten Rezeptor NKp46-KiBAP-αPSCA-BAP auf der Oberfläche tragen, an der Population von YTS NK-Zellen, die den biotinylierten Rezeptor NKp46-KiBAP besitzen. Es wurden Ansätze mit Proteinmengen von 1 μg, 2,5 μg, 5 μg und 10 μg biotinylierten αPSCA-BAP genutzt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

Der Anteil von YTS NK-Zellen, bei dem der Zusammenbau eines vollständigen CAR bestehend aus dem biotinylierten Rezeptor NKp46-KiBAP und dem biotinylierten Einzelkettenantikörper αPSCA-BAP gelang, war abhängig von der eingesetzten Proteinmenge αPSCA-BAP. Er nahm zunächst mit steigender Proteinmenge von 26,4 % (1,0 μg) auf 39,9 % (2,5 μg) zu und erreichte bei 53,3 % (5,0 μg) sein Maximum (Abbildung 39, Säule 1-3). Bei einer höheren Proteinmenge von 10 μg sank der Anteil der YTS NK-Zellen mit vollständigen CAR auf 19,1 % ab (Abbildung 39, Säule 4). Damit wurde der Nachweis erbracht, dass der erfolgreiche Zusammenbau des modular aufgebauten CAR NKp46-KiBAP-αPSCA-BAP möglich ist.

4 Diskussion

Die Entwicklung neuer Immuntherapieansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen stellt einen aktuellen Forschungsschwerpunkt dar. Das Hauptaugenmerk der Immuntherapie liegt dabei auf der spezifischen Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung von gesunden Körperzellen. Neben der Gabe von monoklonalen, tumorspezifischen Antikörpern scheint die adoptive Immuntherapie mit tumorspezifischen, zytotoxischen Immunzellen ein vielversprechender Ansatz zu sein (Cheng *et al.*, 2013; Ljunggren & Malmberg, 2007; Terme *et al.*, 2008). Zur Gruppe der zytotoxischen Immunzellen gehören die T-Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen. Da sie in der Lage sind in Gewebe einzuwandern, können sie einzelne Tumorzellen und abgesiedelte Metastasen erkennen und eliminieren, die bei der konventionellen Tumortherapie meist nicht erfasst werden (Boissonnas *et al.*, 2007; Cooper, Fehniger & Caligiuri, 2001). Somit stellen sie einen potenziellen Schutz vor einer Rückkehr des Tumors (Rezidiv) dar. Die Abtötung der Tumorzellen erfolgt dabei über die Induktion der Apoptose ohne Schädigung gesunder Körperzellen (Barry & Bleackley, 2002; Nagata & Golstein, 1995).

In ersten klinischen Versuchen im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie wurden tumorspezifische T-Lymphozyten eingesetzt, die *ex vivo* expandiert und im Anschluss in Krebspatienten transferiert wurden (Dudley *et al.*, 2002; Rosenberg *et al.*, 1989). Allerdings ist die Reaktivität zytotoxischer T-Lymphozyten abhängig von der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle (Zinkernagel & Doherty, 1974). Aufgrund von Tumorevasionsmechanismen ist deren Expression jedoch häufig herabgesetzt, so dass die zytotoxischen T-Lymphozyten in ihren Effektorfunktionen eingeschränkt sind (Hicklin, Marincola & Ferrone, 1999). Aus diesem Grund wurden chimäre Antigenrezeptoren (CAR) entwickelt, mit deren Hilfe eine MHC-unabhängige Erkennung von Tumorantigenen möglich ist. In präklinischen und klinischen Studien wurde dabei die Funktionalität CAR-armeder, zytotoxischer T-Lymphozyten demonstriert (Cartellieri *et al.*, 2010; Restifo, Dudley & Rosenberg, 2012). Die Spezifität der eingesetzten CAR war dabei unter anderem gegen CD20 auf B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (Till *et al.*, 2008), gegen den α -Folatrezeptor auf Ovarialkarzinomen (Kershaw *et al.*, 2006), gegen CD19 auf B-Zell-Leukämien (Brentjens & Curran, 2012; Davila *et al.*, 2012; Kochenderfer & Rosenberg, 2013) und gegen PSCA auf Prostatakarzinomen (Abate-Daga *et al.*, 2014; Katari *et al.*, 2011) gerichtet.

Neben zytotoxischen T-Lymphozyten werden NK-Zellen erfolgreich in der adoptiven Immuntherapie eingesetzt (Beelen *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2013; Curti *et al.*, 2011). Der Vorteil bei der Verwendung von NK-Zellen im Gegensatz zu T-Lymphozyten liegt zum einen darin, dass NK-Zellen unabhängig von einem vorangegangenen Antigenkontakt zytotoxisch aktiv werden und dabei natürlicherweise über verschiedene Mechanismen zur

Abtötung von Tumorzellen verfügen (Caligiuri, 2008). Zum anderen ist der Schutz vor Rezidivkrankungen durch die „Graft-versus-Leukemia“ (GvL)-Reaktion und das Ausbleiben einer „Graft-versus-Host“ (GvH)-Reaktion bei der allogenen NK-Zellimmuntherapie vorteilhaft (Ruggeri *et al.*, 2001). Zur Steigerung der natürlichen antitumoralen Effektorfunktionen der NK-Zellen werden ebenfalls Strategien zu deren genetischen Modifikation mittels chimärer Antigenrezeptoren verfolgt (Imai, Iwamoto & Campana, 2005; Müller *et al.*, 2008; Schirrmann & Pecher, 2005). Dabei belegten bereits eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien die Sicherheit und Funktionsfähigkeit CAR-armeder NK-Zellen (Cheng *et al.*, 2013).

4.1 Der chimäre Antigenrezeptor NKp46- α PSCA

Als Zielstruktur für die in dieser Arbeit entwickelte Immuntherapiestrategie wurde das Prostata-spezifische Antigen (PSCA) ausgewählt (Gu *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 1998). Vorausgehende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass die Armierung muriner zytotoxischer T-Lymphozyten mit einem PSCA-spezifischen T-Zellrezeptor zu deren Aktivierung und anschließenden Zytotoxizität gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien führte (Morgenroth *et al.*, 2007). Die Erkennung des tumorassoziierten Antigens PSCA sollte in dieser Arbeit ebenfalls über einen chimären Antigenrezeptor (CAR) erfolgen. Die meisten in der Literatur beschriebenen CAR bestehen dabei aus einer intrazellulären, aktivierenden Signaluntereinheit, die mit einem extrazellulären Einzelkettenantikörperfragment fusioniert ist (Eshhar *et al.*, 1993; Sadelain, Brentjens & Rivière, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der aktivierende NK-Zellrezeptor NKp46 als Bestandteil eines CAR verwendet. Da dieser natürlicherweise an der NK-Zellvermittelten Lyse von Tumorzellen beteiligt ist (Pessino *et al.*, 1998), sollte dessen antitumorales Potenzial genutzt und durch die Fusion mit einem Einzelkettenantikörperfragment auf ein spezifisches Tumorantigen fokussiert werden. Neben NKp46 setzt sich der generierte CAR NKp46- α PSCA aus dem PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörperfragment α PSCA zusammen. Dieses wurde von Morgenroth *et al.* (2007) von einem monoklonalen Antikörper gegen PSCA abgeleitet und besteht aus den variablen Domänen der schweren und der leichten Immunglobulinkette, die über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. Vorteilhaft bei der Verwendung des Einzelkettenantikörperfragments α PSCA im Vergleich zum vollständigen Antikörper war dessen wesentlich reduzierte Größe bei gleichbleibenden Bindungseigenschaften (Morgenroth *et al.*, 2007). Nach Bindung von PSCA an den CAR NKp46- α PSCA sollten aktivierende Signale über das mit NKp46 assoziierte Signaladapterprotein CD3- ζ (Moretta *et al.*, 1999; Vitale *et al.*, 1998) in die NK-Zellen weitergegeben werden.

4.1.1 Gentechnisch modifizierte YTS und primäre NK-Zellen exprimieren den CAR NKp46- α PSCA

In den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 wurde die Generierung der Expressionsvektoren, die für den CAR NKp46- α PSCA sowie die Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA kodieren, dargestellt. Mit Hilfe dieser Vektoren wurden mittels lentiviralen Gentransfers die permanenten YTS NK-Zelllinien YTS-NKp46- α PSCA-Puro, YTS-NKp46-CDS-Puro, YTS-NKp46-CDS-k-Puro und YTS-NKp46-k- α PSCA-Puro etabliert. Die so erzeugten Zelllinien wurden im Anschluss durchflusszytometrisch auf die Expression von NKp46 im Vergleich zu den bereits endogen NKp46-exprimierenden, parental YTS NK-Zellen untersucht (3.1.3). Dabei wurde eine über mehrere Monate stabile, deutlich verstärkte NKp46-Oberflächenexpression bei allen generierten YTS NK-Zelllinien im Vergleich zu den Wildtypzellen nachgewiesen (Abbildung 6). Jedoch zeigten die YTS NK-Zellen, in die die um ihre intrazelluläre Domäne verkürzten Kurzkontrollkonstrukte NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA eingebracht wurden, eine reduzierte NKp46-Expression im Vergleich zu denen, die die entsprechenden Vollängenkonstrukte NKp46-CDS und NKp46- α PSCA exprimierten. Die intrazelluläre Domäne von NKp46, deren Funktion bisher nicht bekannt ist, scheint demnach in dessen erfolgreiche Oberflächenexpression involviert zu sein. Weiterhin wurden die kleineren Konstrukte NKp46-CDS (34,7 kDa) und NKp46-CDS-k (32,5 kDa) besser exprimiert als die beiden CAR-Konstrukte NKp46- α PSCA und NKp46-k- α PSCA, die mit 65,6 kDa beziehungsweise 63,4 kDa ein fast doppelt so großes Molekulargewicht aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass sich mit zunehmender Größe des Rezeptors dessen Oberflächenexpression verringert. Dies wurde ebenfalls in einer Studie von De Oliveira *et al.* (2013) bei der Transduktion primärer NK-Zellen mit CAR-Konstrukten, die unterschiedlichen Molekulargewichte aufwiesen, beobachtet. Neben dem Molekulargewicht könnte eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedliche Oberflächenexpression der CAR- und NKp46-CDS-Konstrukte das verwendete Signalpeptid sein. Während bei den NKp46-CDS-Konstrukten das natürliche NKp46-Signalpeptid den Übergang in den sekretorischen Weg vermittelte, wurden die CAR-Konstrukte mit dem murinen Igk-Signalpeptid fusioniert. Seine Eignung zur Sekretion rekombinanter Immunglobuline und seine nicht immunogene Wirkung wurden in mehreren Studien nachgewiesen (Beerens *et al.*, 2008; Horynová *et al.*, 2012; Reavy *et al.*, 2000). Jedoch scheint es im Vergleich zum natürlichen NKp46-Signalpeptid weniger effizient die Oberflächenexpression zu vermitteln. In einer Studie von Daugherty *et al.* (1990) wurde bereits demonstriert, dass die Stärke der Sekretion eines Proteins maßgeblich abhängig von dem mit ihm fusionierten Signalpeptid ist.

Neben der permanenten NK-Zelllinie YTS erfolgte ebenfalls die Armierung primärer humaner NK-Zellen mit dem CAR (3.1.4). Die primären humanen NK-Zellen wurden zunächst mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten und magnetischer Microbeads (Miltenyi) aus dem peripheren Blut von drei gesunden Spendern isoliert (2.5.1.2) und anschließend deren Reinheit durchflusszytometrisch überprüft (3.1.4.1). NK-Zellen sind durch die Expression von CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit des T-Zellmarkers CD3 gekennzeichnet (Griffin *et al.*, 1983; Perussia *et al.*, 1983). Über 90 % der isolierten Zellen besaßen diesen Phänotyp, so dass sehr reine NK-Zellpopulationen aufgereinigt wurden (Abbildung 8). Funktionell spielen NK-Zellen unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen (Cerwenka & Lanier, 2001). Aufgrund dessen weisen sie eine gewisse Resistenz gegen virale Infektionen auf (Lanier, 2008), so dass sich die lentivirale Transduktion primärer NK-Zellen mit den herkömmlichen Protokollen als schwierig erwies (Sutlu *et al.*, 2012). Vergleichende Untersuchungen von Müller (2013) zeigten, dass die lentivirale Transduktion mit einem modifizierten Protokoll von Sutlu (Sutlu *et al.*, 2012), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, zu deutlich verbesserten Transduktionseffizienzen und Oberflächenexpressionen im Vergleich zu den etablierten Protokollen führte. Dabei erfolgte eine Spintransduktion der NK-Zellen unter Zugabe des TBK1 / IKK ϵ -Inhibitors BX795. Dieser hemmt die Signalkaskade des „Toll-like-Rezeptors“ 3, wodurch die Resistenz der NK-Zellen gegenüber Virusinfektionen gemindert wird (Sutlu *et al.*, 2012). Des Weiteren wurden dem NK-Zellmedium die beiden Interleukine IL-2 und IL-21 zugegeben, die zum einen die NK-Zellproliferation fördern (Clark *et al.*, 2009) und zum anderen die Ausreifung und Zytotoxizität der NK-Zellen begünstigen (Brady *et al.*, 2004; Parrish-Novak *et al.*, 2000). Die modifizierten NK-Zellen wurden im Anschluss an die Transduktion durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von NKp46 untersucht (3.1.4.3). Dabei zeigte sich, dass die NKp46-Oberflächenexpression auf den Wildtyp- und den modifizierten NK-Zellen stark spenderabhängig war (Abbildung 10). So wurde eine stabile, verstärkte NKp46-Expression in allen modifizierten NK-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-NK-Zellen bei den Spendern 1 und 3 nachgewiesen. Bei Spender 2 war dies nur zum Teil der Fall. Solche spenderabhängigen Schwankungen der Rezeptorexpression wurden ebenfalls in einer Studie von De Oliveira *et al.* (2013) beobachtet. Des Weiteren schwankte die Transduktionseffizienz zwischen den unabhängigen Transduktionen eines Spenders, was heterogene NKp46-Expressionsraten nach sich zog. Mögliche Ursachen hierfür könnten der Gesundheitszustand der Spender und die Vitalität der isolierten NK-Zellen sein. Eine weitere Rolle könnte die schwankende Virustiterqualität gespielt haben. Guven *et al.* (2005) und Micucci *et al.* (2006) zeigten bereits, dass die Virustiterqualität die Transduktionseffizienzen primärer NK-Zellen stark beeinflusst. Spenderunabhängig wurden die bereits bei den YTS NK-Zellen beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich der

geringeren Oberflächenexpression der Kurzkontrollkonstrukte im Vergleich zu den Vollängenkonstrukten sowie der großen CAR-Konstrukte im Vergleich zu den kleinen NKp46-CDS-Konstrukten gemacht (Abbildung 10). Prinzipiell wurden jedoch sehr gute Expressionsraten des CAR NKp46- α PSCA vor allem in den NK-Zellen von Spender 1 und 3 erzielt.

4.1.2 Die eingesetzten Zellen sind durch verschiedene Oberflächenmarker charakterisiert

Die eingesetzten YTS und primären NK-Zellen sowie die verwendeten Tumorzelllinien wurden durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von verschiedenen Oberflächenmarkern untersucht, die das spezifische zytotoxische Potenzial CAR-armierter NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen beeinflussen. Um dies abzuschätzen, wurden zunächst die YTS und primären NK-Zellen auf die Expression der Liganden-Rezeptor-Paare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 überprüft, die eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen (Oshimi *et al.*, 1996; Zamai *et al.*, 1998; 3.1.3.2 und 3.1.4.4). Aufgrund der fehlenden Expression von FasL und TRAIL auf der Oberfläche der YTS und primären NK-Zellen wurde eine CAR-unabhängige Abtötung von FasR, TRAIL-R1 oder TRAIL-R2-exprimierenden Tumorzelllinien ausgeschlossen (Abbildung 7 und 11). Eine Studie von Berg *et al.* (2009) bestätigte die fehlende FasL- und TRAIL-Expression auf frisch isolierten, ruhenden, primären NK-Zellen. Die in dieser Arbeit für diese Untersuchung genutzten NK-Zellen waren ebenfalls frisch isoliert, jedoch schon schwach durch Zugabe von IL-2 und Aktivierungsbeads zum Medium aktiviert. Dies war vermutlich für eine FasL- und TRAIL-Expression nicht ausreichend. Bei längerer *in vitro* Aktivierung und Expansion der NK-Zellen nimmt allerdings die Expression von FasL schwach und von TRAIL stark zu (Berg *et al.*, 2009). Die YTS und primären NK-Zellen exprimierten jedoch in hoher Dichte FasR auf ihrer Oberfläche. Über diesen Rezeptor wäre eine Apoptose-Induktion durch FasL-exprimierende Tumorzellen möglich. Die FasL-Expression stellt einen Weg der Immunevasion von Tumorzellen dar, mit deren Hilfe sie Apoptose in angreifenden Immuneffektorzellen induzieren (Töpfer *et al.*, 2011). Um dies zu überprüfen, wurden die eingesetzten Tumorzelllinien ebenfalls auf die Expression der Liganden-Rezeptor-Paare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 untersucht (3.1.5.2). Dabei exprimierte keine der verwendeten Tumorzelllinien FasL (Abbildung 13, Diagramm 3), wodurch eine FasL-vermittelte Apoptose-Induktion in die FasR-exprimierenden YTS und primären NK-Zellen wenig wahrscheinlich ist. Weiterhin wurde kein TRAIL von diesen Zelllinien exprimiert (Abbildung 13, Diagramm 4). Die Expression von FasR, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 war bei einem Großteil der ver-

wendeten Tumorzellen nicht oder nur schwach ausgeprägt (Abbildung 13, Diagramm 3 und 4). Dies stellt ebenfalls einen Tumorevasionsmechanismus dar, mit dem sich die Tumorzellen der über die Immuneffektorzellen vermittelten Apoptose-Induktion entziehen (Chen *et al.*, 2010; Hersey & Zhang, 2001). Nur die RT-4- beziehungsweise H4-Zelllinie wären sensitiv für eine FasL- beziehungsweise TRAIL-vermittelte Zytotoxizität. Da diese Liganden jedoch von den YTS und primären NK-Zellen nicht exprimiert wurden, konnte dies ebenso ausgeschlossen werden. Jedoch spielen auch andere Oberflächenmarker auf den Tumorzellen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Inhibierung von YTS und primären NK-Zellen. Deren Aktivität wird durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert, die über die An- oder Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker auf den Zielzellen vermittelt werden (Cerwenka & Lanier, 2001). So induzieren das klassische HLA-Klasse I-Molekül HLA-ABC über inhibitorische KIR sowie das nichtklassische HLA-Klasse I-Molekül HLA-E über CD94/NKG2A und CD94/NKG2B inhibierende Signale in die NK-Zelle (Kärre *et al.*, 1986; Kärre, 1995; López-Botet & Bellón, 1999). Stressinduzierte Oberflächenmoleküle auf transformierten Zellen, wie MIC A/B, geben wiederum aktivierende Signale an die NK-Zelle weiter (Bauer *et al.*, 1999). Deshalb wurden weitere durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Abbildung 13, Diagramm 1 und 2). Alle Tumorzelllinien wiesen eine starke Expression von HLA-ABC auf, so dass nur eine geringe (HT1376 und HEK293T) NK-Zellaktivierung über den „missing self“-Erkennungsmechanismus erfolgen könnte (Kärre *et al.*, 1986). In geringer Dichte wurde HLA-E von den Tumorzelllinien RT-4 und H4 exprimiert, das an den CD94/NKG2A NK-Zellrezeptor bindet und inhibierende Signale an die NK-Zelle weitergibt (López-Botet & Bellón, 1999). Die Stressproteine MIC A/B, die vom aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D erkannt werden (Bauer *et al.*, 1999), wurden auf der Oberfläche der RT-4 Zelllinie nachgewiesen. Dadurch wäre eine NK-Zellaktivierung über den „induced self“-Erkennungsmechanismus möglich (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden die in dieser Arbeit eingesetzten Tumorzelllinien durchflusszytometrisch auf ihre natürliche beziehungsweise rekombinante PSCA-Expression untersucht (3.1.5.1). Da die natürlicherweise PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien eine wesentlich geringere PSCA-Expression im Vergleich zu den rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien aufwiesen (Abbildung 12), ist bei diesen mit einer deutlich geringeren CAR-spezifischen NK-Zell-Reaktivität zu rechnen.

4.1.3 CAR-exprimierende YTS und primäre NK-Zellen weisen eingeschränkte Effektorfunktionen auf

Nach erfolgreicher Expression des CAR NKp46- α PSCA und der entsprechenden Kontrollkonstrukte in den YTS und primären humanen NK-Zellen wurde *in vitro* deren Reaktivität gegenüber histogenetisch unterschiedlichen, PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Chrom-Freisetzungssassays die spezifische Zytotoxizität von CAR-armi­erten YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien analysiert (3.1.6.1). Dabei wurden keine (HEK293T-PSCA) oder nur sehr schwache Lysen (H4-PSCA und HT1376) beobachtet, unabhängig davon ob die Kokultivierung mit CAR-armi­erten oder Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen erfolgte (Abbildung 14). Nur bei der Tumorzelllinie RT-4 wurden stärkere, CAR-unabhängige Lysen ermittelt. Diese sind vermutlich auf das hohe MIC A/B-Expressionsniveau in dieser Zelllinie zurückzuführen (Abbildung 13, Diagramm 2). Dadurch kam es höchstwahrscheinlich zur Aktivierung der YTS NK-Zellen über den „induced self“-Erkennungsmechanismus (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001). Auch bei den Chrom-Freisetzungssassays mit den CAR-armi­erten beziehungsweise Kontrollkonstrukt-exprimierenden primären humanen NK-Zellen wurden nur unspezifische Lysen beobachtet, wenngleich diese zum Teil sehr stark waren (Abbildung 15). Diese waren unabhängig von einer PSCA-Expression der Tumorzellen, da ebenfalls die PSCA-negative, parentale HEK293T-Zelllinie im hohen Maße lysiert wurde. Ursache hierfür war vermutlich eine basale Aktivierung der NK-Zellen durch die Transduktion und Selektion sowie die *in vitro* Kultivierung, die wahrscheinlich als Stressfaktoren auf die NK-Zellen einwirkten. Weiterhin könnten die nicht perfekte Übereinstimmung („mismatch“) zwischen dem HLA-Typ der Tumorzelllinien und der KIR-Expression der primären NK-Zellen beziehungsweise die Interaktion zwischen den NCR der NK-Zellen mit noch unbekannt­en Liganden auf der Tumorzelloberfläche aktivierende Signale in die NK-Zellen vermitteln (Ruggeri *et al.*, 1999; Ruggeri *et al.*, 2002; Igarashi *et al.*, 2004). Somit wurde weder für die YTS NK-Zellen noch die primären humanen NK-Zellen eine CAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen nachgewiesen. Vor Beginn der Arbeiten ist davon ausgegangen worden, dass das mit NKp46-assoziierte endogene Signaladapterprotein CD3- ζ , das die über NKp46 vermittelten, aktivierenden Signale in das Zellinnere weiterleitet, beim Einbringen der modifizierten NKp46-Rezeptoren ebenso verstärkt exprimiert wird. Ausgangspunkt dieser Vermutung war, dass CD3- ζ neben NKp46 außerdem mit den Rezeptoren CD16 (Fc γ RIII) und NKp30 assoziiert (Lanier, Yu & Phillips, 1989; Pende *et al.*, 1999) und so ein ausreichendes Reservoir an CD3- ζ -Molekülen zur Verfügung steht beziehungsweise die CD3- ζ -Expression

an das Expressionsniveau der assoziierten Rezeptoren angepasst wird. Dies ist vermutlich nicht der Fall, wie die fehlende spezifische Zytotoxizität CAR-armierter NK-Zellen zeigt. Eine mögliche Ursache hierfür wäre demnach die nicht ausreichend erhöhte Expression von CD3- ζ bei gleichzeitiger Überexpression von NKp46.

Die Reaktivität aktivierter NK-Zellen ist nicht nur durch ihre Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten und malignen Zellen gekennzeichnet, sondern ebenso durch ihre Zytokinsekretion (Caligiuri, 2008). Verschiedene Studien zeigen, dass CAR-armierte NK-Zellen proinflammatorische Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , bei Antigenkontakt verstärkt sekretieren (Altvater *et al.*, 2009; Kruschinski *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde die IFN- γ -Sekretion modifizierter primärer NK-Zellen parallel zu ihrer Zytotoxizität untersucht (3.1.6.2). Ähnlich wie bei den Chrom-Freisetzungssassays ließ sich bei den NK-Zellen beider Spender feststellen, dass es meist zu einer erhöhten IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen unabhängig vom eingebrachten Konstrukt kam, sobald diese mit Zielzellen kokultiviert wurden (Abbildung 16). Auch hierfür war vermutlich eine basale Aktivierung der NK-Zellen durch die Stressfaktoren Transduktion, Selektion und *in vitro* Kultivierung verantwortlich. Weitere Ursachen für die basale Aktivierung wären die Diskrepanz („mismatch“) zwischen dem HLA-Typ der Tumorzelllinien und der KIR-Expression der primären NK-Zellen beziehungsweise die Interaktion der NCR mit bisher noch nicht bekannten Liganden auf der Tumorzelloberfläche, wodurch aktivierende Signale in die NK-Zellen vermittelt werden könnten (Igarashi *et al.*, 2004; Ruggeri *et al.*, 1999; Ruggeri *et al.*, 2002). Bei Spender 1 wurde eine CAR-abhängige, verstärkte IFN- γ -Sekretion modifizierter NK-Zellen bei Kokultivierung mit PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien mit Ausnahme der RT-4-Zelllinie nachgewiesen. Ursache hierfür könnte die schwache PSCA-Oberflächenexpression von durchschnittlich 33,8 % auf den RT-4-Zellen sein (Abbildung 12). Dadurch kam es vermutlich zu weniger CAR-Antigen-Kreuzvernetzungen im Vergleich zu den anderen eingesetzten Tumorzelllinien. Folglich wurden weniger Aktivierungssignale in die NK-Zellen weitergeleitet. Grundsätzlich wurde jedoch gezeigt, dass eine CAR-vermittelte Aktivierung von primären humanen NK-Zellen möglich ist. Im Gegensatz zu Spender 1 erfolgte bei Spender 2 nur bei der Kokultivierung mit HEK293T-PSCA-Zellen eine CAR-abhängige, verstärkte IFN- γ -Ausschüttung. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die wesentlich schlechtere CAR-Expression der modifizierten NK-Zellen von Spender 2 im Vergleich zu denen von Spender 1 (Abbildung 10). Eine starke CAR-Expression ist jedoch für eine ausreichende Aktivierung der Effektorfunktionen modifizierter Immunzellen zwingend notwendig (Kershaw *et al.*, 2006). Als eine weitere mögliche Ursache für die zum Teil ähnlich ausgeprägte IFN- γ -Sekretion CAR-modifizierter NK-Zellen im Vergleich zu derjenigen der Kontroll-NK-Zellen wurde die bereits im Rahmen der Chrom-Freisetzungssassays beschriebene, mangelnde Verfügbarkeit von CD3- ζ in Betracht gezogen. Um den Einfluss des CD3-

ζ-Expressionsniveaus auf die Aktivierung der Effektorfunktionen CAR-armierter NK-Zellen näher zu untersuchen, erfolgte im weiteren Verlauf der Arbeit die Koexpression des CAR NKp46-αPSCA und der CD3-ζ-Kette (Kapitel 3.2).

4.2 Koexpression des chimären Antigenrezeptors NKp46-αPSCA und der CD3-ζ-Kette

4.2.1 Gentechnisch modifizierte YTS NK-Zellen koexpressieren den CAR NKp46-αPSCA und die CD3-ζ-Kette

Der in Kapitel 3.2.1 generierte Expressionsvektor, der für die CD3-ζ-Kette kodiert, ermöglichte deren Überexpression in den YTS NK-Zellen. Mit Hilfe dieses Vektors wurde mittels lentiviralen Gentransfers die CD3-ζ-Kette stabil in das Genom der CAR-armierten beziehungsweise Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen integriert. Als weitere Kontrolle wurden YTS-CD3-ζ-Zellen erzeugt. Die so etablierten Zelllinien wurden im Anschluss durchflusszytometrisch auf die Expression von CD3-ζ untersucht (3.2.3). Dabei wurde eine über mehrere Monate stabile, gleichmäßige CD3-ζ-Oberflächenexpression bei allen generierten YTS NK-Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 18). Parallel dazu wurde die NKp46-Oberflächenexpression ermittelt. Dabei wurde kein wesentlich verändertes Expressionsniveau des CAR NKp46-αPSCA oder der Kontrollkonstrukte im Vergleich zur Einzelexpression (3.1.2) festgestellt. Somit wurde erfolgreich die Koexpression der CD3-ζ-Kette und des CAR beziehungsweise seiner Kontrollkonstrukte in den YTS NK-Zellen nachgewiesen.

Die Überexpression der CD3-ζ-Kette wurde mittels Western Blot-Analysen bestätigt (3.2.2). So zeigte die densitometrische Auswertung eine deutlich verstärkte Expression der unphosphorylierten Form des CD3-ζ-Ketten-Monomers in den modifizierten YTS NK-Zellen im Vergleich zu den YTS Wildtyp-NK-Zellen (Abbildung 19). Zusätzlich wurden die drei phosphorylierten Formen des CD3-ζ-Ketten-Monomers bei den modifizierten YTS NK-Zellen detektiert. Nach Kreuzvernetzung aktivierender Rezeptoren, wie NKp46, werden die aktivierenden Motive (ITAM) der assoziierten Signaladapterproteine, wie CD3-ζ, phosphoryliert (Augugliaro *et al.*, 2003). Dies wiederum induziert eine Signalkaskade, die aktivierende Signale über die Proteintyrosinkinase ZAP-70 in das Zellinnere weitergibt (Weissman *et al.*, 1988b). Dies deutet auf eine basale Aktivierung der modifizierten YTS NK-Zellen durch die CD3-ζ-Überexpression hin, die im Rahmen der Überprüfung des zytotoxischen Potenzials modifizierter YTS NK-Zellen untersucht wurde.

Die Koexpression der CD3- ζ -Kette und des CAR NKp46- α PSCA beziehungsweise seiner Kontrollkonstrukte war in den primären humanen NK-Zellen nicht möglich. Primäre NK-Zellen sind sehr sensibel, so dass nach der ersten Transduktion und der anschließenden Selektion keine ausreichende Expansion der transduzierten NK-Zellen gelang. Somit standen für eine weitere erfolgreiche Transduktion nicht genügend NK-Zellen ($< 1,5 \times 10^6$ NK-Zellen) zur Verfügung. Ein möglicher Lösungsansatz für dieses experimentelle Problem wäre die Entwicklung eines bicistronischen Expressionsvektors, der zwei Expressionskassetten enthält und somit sowohl für die CD3- ζ -Kette als auch den CAR beziehungsweise die Kontrollkonstrukte kodiert. In einer Studie von Di Stasi *et al.* (2009) wurde bereits die erfolgreiche Transduktion eines CAR und des Chemokinrezeptors CCR4 in T-Lymphozyten mittels eines bicistronischen Expressionsvektors demonstriert. Jedoch wurde ebenfalls gezeigt, dass solche großen bicistronischen Expressionsvektoren eine schlechtere Transduktionseffizienz als die kleineren, herkömmlichen Expressionsvektoren aufweisen. Dies wurde bereits bei der Transduktion der größeren CAR-Expressionsvektoren im Vergleich zu den kleineren NKp46-CDS-Expressionsvektoren deutlich (Abbildung 6). Um die natürliche CD3- ζ -Expression der primären humanen NK-Zellen einzuschätzen, wurde diese mittels Western Blot-Analyse im Vergleich zu der CD3- ζ -Expression parentaler beziehungsweise modifizierter YTS NK-Zellen ermittelt (3.2.2). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass das CD3- ζ -Expressionsniveau spenderunabhängig zwischen dem der parentalen und dem der CD3- ζ -überexprimierenden YTS NK-Zellen lag (Abbildung 20). Dieses CD3- ζ -Expressionsniveau war jedoch, wie im Kapitel 3.1.6.1 gezeigt, nicht ausreichend um eine Aktivierung des zytotoxischen Potenzials der CAR-arnierten NK-Zellen zu bewirken. Des Weiteren wurden keine phosphorylierten Formen des CD3- ζ -Ketten-Monomers nachgewiesen. Die in den Abbildungen 15 und 16 beobachtete basale Aktivierung der primären NK-Zellen kann daher nicht über die CD3- ζ -Kette vermittelt worden sein, sondern muss andere Ursachen haben. Aufgrund der nicht gelungenen Koexpression von CAR und CD3- ζ -Kette wurden die weiterführenden Experimente nur mit YTS-Zellen durchgeführt.

4.2.2 CAR- und CD3- ζ -koexprimierende YTS NK-Zellen sind reaktiv gegen PSCA-positive Tumorzellen

Nach erfolgreicher Koexpression der CD3- ζ -Kette und des CAR NKp46- α PSCA beziehungsweise der Kontrollkonstrukte wurde das zytotoxische Potenzial der so modifizierten YTS NK-Zellen näher untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe von Chrom-Freisetzungssassays überprüft, ob die Überexpression der CD3- ζ -Kette eine Verbesserung der spezifischen Zytotoxizität CAR-armierter YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien zur Folge hat (3.2.3.1). Dabei wurde die Hypothese, dass die nicht ausreichende Expression der CD3- ζ -Kette die Ursache für die unzureichende Reaktivität CAR-armierter YTS NK-Zellen darstellt, bestätigt. Die Auswertung der Chrom-Freisetzungssassays zeigte eine starke statistisch signifikante Lyse PSCA-exprimierender Tumorzellen bei der Kokultivierung mit CAR-armierten YTS NK-Zellen, wohingegen die Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen keine spezifische Lyse vermittelten (Abbildung 21). Ausgenommen davon waren die YTS NK-Zellen mit dem um seine intrazelluläre Domäne verkürzten CAR. Deren CAR-spezifische Lysen fielen jedoch deutlich geringer aus, als die mit dem Vollängenkonstrukt erzielten spezifischen Lysen. Die Ursache hierfür war vermutlich die bereits unter 4.1.1 erläuterte, schlechtere Oberflächenexpression von NKp46-k- α PSCA im Vergleich zum vollständigen CAR. Somit kam es wahrscheinlich zu einer wesentlich geringeren Aktivierung der so modifizierten YTS NK-Zellen. Zudem wurde gezeigt, dass eine Verlängerung der Kokultivierungszeit von 6 auf 22 Stunden zu einer deutlichen Verstärkung der CAR-abhängigen, spezifischen Lyse PSCA-exprimierender Tumorzellen führte. Jedoch kam es gleichfalls zum leichten Anstieg der CAR-unabhängigen Lyse durch die Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen. Ursache hierfür ist vermutlich die Hochregulation von Stressproteinen auf der Tumorzelloberfläche, da die Tumorzellen während der Kokultivierung nicht in ihrem Standardmedium kultiviert wurden. Da YTS NK-Zellen den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D in geringem Maße auf ihrer Oberfläche tragen (Müller, 2013), erfolgte vermutlich eine Aktivierung der YTS NK-Zellen über den „induced self“-Erkennungsmechanismus (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001). Die Stärke der CAR-abhängigen, spezifischen Lyse war zudem abhängig von dem PSCA-Expressionsniveau der verwendeten Tumorzelllinie. So wurde die *per se* PSCA-exprimierende Tumorzelllinie HT1376 im geringeren Maße lysiert als die rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA, da diese mit 41 % eine wesentlich geringe PSCA-Oberflächenexpression aufwies (Abbildung 12). Dies war jedoch nicht der Fall bei der *per se* nur zu 34 % PSCA-exprimierenden Tumorzelllinie RT-4. Der Grund hierfür war deren relativ starke Expression der Stressproteine MIC A/B von fast 50 %, die wiederum vermutlich die Aktivierung der YTS NK-Zellen über den „induced self“-Erkennungsmechanismus zur Folge hatte (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001). Dies erklärt gleichfalls die im Vergleich zu den anderen Tumorzelllinien relativ starke unspezifische Lyse bei Kokultivierung mit den Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen.

Um nachzuweisen, dass die gesteigerte Zytotoxizität CAR-armierter YTS NK-Zellen von der Zugänglichkeit des PSCA auf der Tumoroberfläche abhängig ist, wurde in einem wei-

teren Versuch die Bindung des CAR an sein Epitop durch den Einsatz von anti-PSCA-Antikörpern blockiert. Da der von NK-Zellen exprimierte Fc-Rezeptor FcγRIII (CD16) in der Lage ist den Fc-Anteil von IgG-Antikörpern, wie dem verwendeten anti-PSCA-Antikörper, zu binden und dadurch eine unerwünschte CAR-unspezifische, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität („Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“, ADCC) in den Tumorzellen zu induzieren (Lanier, Ruitenberg & Phillips, 1988), wurde zuvor jedoch dessen Expression auf den YTS NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 24). Im Gegensatz zu den primären humanen NK-Zellen exprimierte die permanente YTS NK-Zelllinie, vermutlich aufgrund der malignen Transformation, nur in sehr geringem Maße (unter 5,2 %) den Fc-Rezeptor FcγRIII. Somit konnte die Induktion der ADCC über FcγRIII nahezu ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der Chrom-Freisetzungssassays zeigte trotz PSCA-Abdeckung eine, wenn auch deutlich geringere, spezifische Lyse der Tumorzellen durch die CAR-armierten YTS NK-Zellen (Abbildung 24b). In einer Studie von Esser *et al.* (2012) wurde ebenfalls beobachtet, dass trotz Epitopabdeckung eine geringe CAR-spezifische Lyse erfolgte. Diese verstärkte sich durch eine Verlängerung der Kokultivierungszeit von 6 auf 22 Stunden (Abbildung 24a). Ursache hierfür war vermutlich die Internalisierung und der anschließende Abbau des Antikörper-gebundenen PSCA durch die Tumorzelle und die Expression von neuem, nicht abgedecktem PSCA während der Kokultivierung. Letzteres wiederum diente als Zielstruktur für den CAR und führte zur Aktivierung der CAR-armierten YTS NK-Zellen. Jedoch wurde gezeigt, dass die PSCA-Abdeckung die CAR-spezifische Lyse deutlich verringert. Infolgedessen wurde die über den CAR NKp46-αPSCA vermittelte Lyse PSCA-exprimierender Tumorzelllinien bestätigt.

Im Anschluss an den erfolgreichen Nachweis der spezifischen Zytotoxizität CAR-armierter und CD3-ζ-koexprimierender YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien (3.2.3.1) wurde in einem zweiten Kokultivierungsexperiment die Degranulation untersucht (3.2.3.2). Diese wird indirekt über die Expression von CD107a auf der Zelloberfläche von NK-Zellen nachgewiesen. Die CD107a-Expression nach der Degranulation korreliert dabei mit der Zytokinsekretion und der NK-Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen. Somit ist die CD107a-Expression ein Marker für die NK-Zellaktivität nach der Stimulation mit Zielzellen (Alter, Malenfant & Altfeld, 2004). Das bei der Untersuchung der Degranulation eingesetzte Ionophor Monensin zerstört die Golgi-Apparatstruktur und verhindert so den vesikulären Transport in den YTS NK-Zellen, so dass sich durch die inhibierte Degranulation CD107a an der Zelloberfläche ansammelt (Fliesler & Basinger, 1987). Dieses wurde anschließend durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die hierbei gemessene CD107a-Expression war nur bei der Kokultivierung der CAR-armierten und

CD3- ζ -koexprimierenden YTS NK-Zellen mit den rekombinant PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HEK293T-PSCA und H4-PSCA deutlich verstärkt (Abbildung 25). Dies war jedoch nicht der Fall bei der Kokultivierung mit den PSCA-negativen, parental Tumorzelllinien HEK293T und H4. Somit wurde erfolgreich die verstärkte Degranulation CAR-armierter und CD3- ζ -koexprimierender YTS NK-Zellen nach Antigenkontakt demonstriert.

Die Degranulation korreliert nicht nur mit der NK-Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen sondern auch mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ (Alter, Malenfant & Altfeld, 2004). Vor diesem Hintergrund wurde in einem weiteren Kokultivierungsexperiment die IFN- γ -Sekretion modifizierter YTS NK-Zellen gegenüber den *per se* PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien HT1376 und RT-4 ermittelt (3.2.3.3). Wie bei den vorangegangenen Experimenten bereits beobachtet, wurde eine spezifische Reaktivität CAR-armierter und CD3- ζ -koexprimierender YTS NK-Zellen in Form einer verstärkten IFN- γ -Sekretion nach Antigenkontakt festgestellt (Abbildung 26).

Zusammenfassend wurde erfolgreich eine spezifische Reaktivität CAR-armierter YTS NK-Zellen gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien in Form einer spezifischen Zytotoxizität beziehungsweise verstärkten Degranulation und IFN- γ -Sekretion demonstriert. Jedoch war dies nur der Fall, wenn die CD3- ζ -Kette überexprimiert wurde. Ausreichende Mengen dieses Signaladaptermoleküls sind somit essentiell, um genügend aktivierende Signale nach CAR-Antigen-Kreuzvernetzung in die YTS NK-Zellen weiterzuleiten und deren Effektorfunktionen zu aktivieren. Klinische Studien zeigten bereits, dass ein Teil der Patienten mit verschiedenen soliden und hämatologischen Krebserkrankungen eine deutlich verringerte CD3- ζ -Expression auf ihren NK-Zellen aufwies, wodurch deren Effektorfunktionen, wie die Sekretion von IFN- γ und TNF- α , ebenfalls wesentlich reduziert waren (Frydecka *et al.*, 2001; Kono *et al.*, 1996). Somit war die nicht natürlicherweise verstärkte CD3- ζ -Expression nach Einbringen der modifizierten NKp46-Rezeptoren Ursache für die fehlenden CAR-spezifischen Zytotoxizitäten und die geringe CAR-spezifische IFN- γ -Sekretion im ersten Teil der Arbeit (3.1). Eine basale Aktivierung der YTS NK-Zellen durch die Überexpression der CD3- ζ -Kette, die zunächst anhand der Western Blot-Analyse vermutet wurde (4.2.1), konnte jedoch ausgeschlossen werden, da es zu keiner wesentlichen Reaktivität der Kontrollkonstrukt-exprimierenden YTS NK-Zellen kam. Auch wurden PSCA-negative Tumorzelllinien nur minimal von den CAR-armierten YTS NK-Zellen lysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass die mit einem CAR ausgestatteten YTS NK-Zellen *in vitro* dazu befähigt sind, ihr Zielantigen zu erkennen und anschließend ihr zytotoxisches Potenzial gegen diese Tumorzellen zu entfalten.

4.2.3 Weiterführende Arbeiten und mögliche Optimierungen

Nachdem *in vitro* erfolgreich die Aktivierung der CAR-armierten und CD3- ζ -koexprimierenden YTS NK-Zellen und deren spezifische Reaktivität gegen PSCA-exprimierende Tumorzellen nachgewiesen wurden, sollte im nächsten Schritt die antitumorale Reaktion dieser Effektorzellen *in vivo* anhand verschiedener Tumor-Xenograft-Mausmodelle untersucht werden. Dafür würden sich besonders immundefiziente NMRI_{nu/nu} Mäuse eignen (Flanagan, 1966), denen der Thymus und demzufolge Antikörper oder ausgereifte T-Lymphozyten fehlen. Da sie folglich Fremdgewebe tolerieren, kann eine Eliminierung der humanen CAR-armierten und CD3- ζ -koexprimierenden YTS NK-Zellen durch das murine Immunsystem zum großen Teil ausgeschlossen werden. Ein möglicher Versuchsaufbau wäre die Etablierung von subkutanen, PSCA-exprimierenden Tumoren in den NMRI_{nu/nu} Mäusen und die anschließende Behandlung dieser mittels in regelmäßigen Abständen in die Schwanzvene injizierten CAR-armierten und CD3- ζ -koexprimierenden YTS NK-Zellen. Mit Hilfe dieses Tumor-Xenograft-Mausmodells wäre die Untersuchung einer CAR-unspezifischen Immunantwort gegenüber gesunden Geweben und Organen möglich. Des Weiteren könnte nachgewiesen werden, ob es zur Akkumulation der CAR-armierten und CD3- ζ -koexprimierenden YTS NK-Zellen im Tumorgewebe kommt und ob dies ein verzögertes Tumorstadium oder sogar eine vollständige Tumorregrression zur Folge hätte. Für weiterführende Studien würde die Verwendung von TRAMP („Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate“)-Mäusen infrage kommen. Diese entwickeln spontan Prostatatumore, deren Histologie, Progression und Metastasierung dem humanem Prostatakarzinom ähnelt (Gingrich *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1995). Jedoch müsste hierfür das YTS NK-Zellmodell murinisiert werden, da diese Mäuse im Vergleich zu den NMRI_{nu/nu} Mäusen immunkompetent sind und somit die eingebrachten humanen YTS NK-Zellen nicht tolerieren.

In der Mehrzahl der bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien zur Armierung von NK-Zellen mit einem CAR wurden vor allem permanente NK-Zelllinien verwendet, da deren genetische Modifikation einfacher durchzuführen ist (Cheng *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu wurden primäre humane NK-Zellen nur in sechs Studien erfolgreich modifiziert und verwendet (Altvater *et al.*, 2009; Imai, Iwamoto & Campana, 2005; Kruschinski *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Pegram *et al.*, 2008; Shimasaki *et al.*, 2012). Infolgedessen sind weitere Optimierungsarbeiten hinsichtlich einer erfolgreichen Transduktion primärer NK-Zellen notwendig. Da, wie unter 4.2.1 bereits beschrieben, eine Koexpression des CAR und der CD3- ζ -Ketten in primären NK-Zellen nicht möglich war, wäre die Entwicklung eines

bicistronischen Expressionsvektors, der zwei Expressionskassetten enthält, eine für den CAR und eine für die CD3- ζ -Kette, ein möglicher Lösungsansatz. Jedoch würde die Transduktion dieses sehr großen Expressionsvektors in die erfahrungsgemäß ohnehin schlecht transduzierbaren, primären NK-Zellen erheblich erschwert sein. Da die CD3- ζ -Kette zwingend in die NK-Zellen eingebracht werden muss, um eine Aktivierung der NK-Zellen auszulösen, wäre ein weiterer Lösungsansatz die Generierung eines CAR bestehend aus dem CD3- ζ -Signaladapterprotein und dem PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörper α PSCA. Die Reaktivität von T-Lymphozyten, die mit einem solchen CAR armiert worden waren, wurde bereits erfolgreich *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen demonstriert (Abate-Daga *et al.*, 2014; Hillerdal *et al.*, 2014). Verschiedene aussichtsreiche Studien mit CAR-armiernen primären NK-Zellen, bei denen der CAR aus einem Tumorantigen-spezifischen Einzelkettenantikörper und der CD3- ζ -Signaladapterprotein bestand, deuten darauf hin, dass die vielversprechenden Ergebnisse der PSCA-spezifischen, CAR-armiernen T-Lymphozyten ebenfalls mit NK-Zellen erzielt werden könnten (Altvater *et al.*, 2009; Imai, Iwamoto & Campana, 2005; Li *et al.*, 2010; Pegram *et al.*, 2008; Shimasaki *et al.*, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der aktivierende NK-Zellrezeptor NKp46 als Bestandteil eines CAR verwendet. Dessen natürliches antitumorales Potenzial (Pessino *et al.*, 1998) sollte genutzt und durch die Fusion mit dem Einzelkettenantikörperfragment α PSCA spezifisch auf PSCA-exprimierende Tumorzellen gelenkt werden. Die in dieser Arbeit generierten, aussichtsreichen *in vitro* Ergebnisse haben dabei die Grundlage für eine CAR-basierte Immuntherapiestrategie geschaffen. Weiterführende Untersuchungen im Tiermodell werden zeigen, ob sich die PSCA-spezifischen, CAR-armiernen NK-Zellen für eine NK-Zell-basierte Immuntherapie eignen. Jedoch ist im Verlauf dieser Arbeit deutlich geworden, dass die gleichzeitige Überexpression der CD3- ζ -Kette essentiell ist, um eine Aktivierung der NK-Zellen über den generierten CAR zu induzieren. Aufgrund dessen ist NKp46 nicht die günstigste Grundlage für einen CAR, da in Hinblick auf eine klinische Anwendung zusätzliche Arbeitsschritte bei der genetischen Modifikation der NK-Zellen im Vergleich zu einem PSCA-spezifischen CAR mit CD3- ζ notwendig wären. Dies wiederum erfordert einen Mehraufwand an Zeit und Geld. Dennoch war eine Untersuchung von NKp46 als Bestandteil eines CAR wichtig und sinnvoll. Zum einen wurde so das Potenzial des natürlicherweise an der Lyse von Tumorzellen beteiligten NKp46 im Rahmen einer NK-Zell-basierten Immuntherapiestrategie überprüft. Zum anderen konnte dadurch das vorhandene Wissen über die Armierung von NK-Zellen mit tumorspezifischen, chimären Antigenrezeptoren erweitert werden.

4.3 Der biotinylierbare Rezeptor NKp46-KiBAP

Die bisher in Studien verwendeten CAR-armierten NK-Zellen wiesen eine feststehende Spezifität gegenüber einem bestimmten Tumorantigen auf (Cheng *et al.*, 2013). Dies limitiert jedoch die Reaktivität der generierten NK-Zellen auf Tumorzellen, die dieses Antigen tragen. Allerdings kann die Expression von Tumorantigenen nicht nur zwischen verschiedenen Patienten sondern auch innerhalb des Tumors eines Patienten sehr heterogen sein (Fidler & Kripke, 1977; Gerlinger *et al.*, 2012; Monjazeb *et al.*, 2013). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass aufgrund von Tumorevasionsmechanismen die Expression entsprechender Tumorantigene im Laufe der Erkrankung herunterreguliert wird (Monjazeb *et al.*, 2013). Die Generierung eines CAR, dessen Spezifität gegenüber einem Tumorantigen ausgetauscht werden kann, ermöglicht so den universellen Einsatz CAR-armierter NK-Zellen in der adjuvanten Immuntherapie von Tumorerkrankungen. Des Weiteren könnten verschiedene Tumorantigene eines Tumors als Zielstrukturen für eine effektivere Behandlung genutzt werden. Erste vielversprechende *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse wurden bereits in einer Studie von Urbanska *et al.* (2012) mit T-Lymphozyten erzielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein ähnlicher Ansatz mit NK-Zellen erprobt. Dazu wurde der Rezeptor NKp46-KiBAP generiert, der zwei biotinylierbare Biotinakzeptorpeptide besitzt. Unter Ausnutzung der sehr starken Biotin-Avidin-Bindung ist die Bindung von Avidin-gekoppelten Einzelkettenantikörpern mit unterschiedlichen Spezifitäten an diesen Rezeptor möglich. Exemplarisch erfolgte in dieser Arbeit die Kopplung des Einzelkettenantikörpers gegen PSCA an NKp46-KiBAP. Diese neuartige Strategie ermöglicht erstmalig eine flexible Armierung von NK-Zellen gegenüber unterschiedlichen Tumorantigenen und stellt damit einen wesentlichen Vorteil bei der individuellen Behandlung von Krebserkrankungen dar.

4.3.1 Gentechnisch modifizierte YTS NK-Zellen exprimieren den Rezeptor NKp46-KiBAP

Im Kapitel 3.3.1 wurde die Generierung des Expressionsvektors, der für den biotinylierbaren Rezeptor NKp46-KiBAP kodiert, dargestellt. Dieser Rezeptor enthält N-terminal zwei Biotinakzeptorpeptide (BAP), das prokaryontische Kimura-BAP und das eukaryontische, humane Propionyl-Coenzym A-Carboxylase-BAP (hPCoAC-BAP). Da im zweiten Teil dieser Arbeit (3.2) gezeigt wurde, dass eine Aktivierung der Effektorfunktionen CAR-armierter YTS NK-Zellen nur bei Überexpression der CD3- ζ -Kette erfolgt, wurde die unter 3.2.2 generierte YTS NK-Zelllinie YTS-CD3- ζ als Ausgangszelllinie verwendet. Mit Hilfe des oben beschriebenen Expressionsvektors wurden mittels lentiviralen

Gentransfers die permanente YTS NK-Zelllinie YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro und die Nierenkarzinomzelllinie HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro etabliert (3.3.2). Die HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen wurden zur Überprüfung der Expression und anschließenden Biotinylierung von NKp46-KiBAP mitgeführt, da mit dieser Zelllinie bereits gute Erfahrungen hinsichtlich der Biotinylierung sekretierter Proteine in unserer Arbeitsgruppe durch Stefanie Tietze gemacht wurden. Mittels Durchflusszytometrie wurde im Anschluss eine über mehrere Monate stabile, homogene NKp46-KiBAP-Oberflächenexpression bei beiden Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 28 und 29).

4.3.2 NKp46-KiBAP-exprimierende YTS NK-Zellen sind exogen und endogen biotinylierbar

Um zu überprüfen, ob eine Biotinylierung des Rezeptors NKp46-KiBAP prinzipiell möglich ist, wurde zunächst eine exogene Biotinylierung in Anwesenheit von ATP mittels der exogenen Biotinligase BirA von Avidity durchgeführt. In einer Vielzahl von Publikationen, wie zum Beispiel in einer Studie von Howarth *et al.* (2005), wurde erfolgreich die exogene Biotinylierung von Oberflächenproteinen lebender Säugerzellen demonstriert. Diese hat in Hinblick auf eine klinische Anwendung und die erfahrungsgemäß schwer transduzierbaren primären NK-Zellen zudem den Vorteil, dass keine weitere Transduktion einer endogenen Biotinligase in diese Zellen notwendig ist.

Die zuerst durchflusszytometrisch untersuchten HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen waren erfolgreich zu über 96 % bereits nach einer Stunde mit nur 2,5 μ g eingesetzter BirA exogen biotinyliert worden (3.3.3.1). Eine Verlängerung der Inkubationszeit beziehungsweise eine erhöhte Zugabe der BirA führten dabei zu einem erhöhten Biotinylierungsgrad (Abbildung 30b). Diese Versuche demonstrierten, dass die Biotinylierung des Rezeptors NKp46-KiBAP effektiv und vollständig möglich ist. Im Anschluss wurde die Haltbarkeit der Biotinylierung in Hinblick auf weiterführende Versuche untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil biotinylierter Rezeptoren nach Ende der Inkubation mit der exogenen Biotinligase BirA innerhalb von sieben Stunden von 85 % auf unter 5 % absank (Abbildung 31). Die Halbwertszeit lag bei diesem Versuch zwischen drei und vier Stunden, womit die exogene Biotinylierung nur für kurze Versuche geeignet ist. Als Ursache für die kurze Haltbarkeit der Biotinylierung wurden die Internalisierung des biotinylierten Rezeptors und dessen anschließender Abbau vermutet. Um dies nachzuweisen, wäre eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der biotinylierten Rezeptoren von zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixierten YTS NK-Zellen denkbar.

Im Anschluss sollten diese Ergebnisse auf die YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen übertragen werden (3.3.3.2). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten jedoch, dass

nach einer Stunde mit 2,5 µg eingesetzter BirA nur 36,3 % der Zellen exogen biotinyliert wurden (Abbildung 32). Auch nach Steigerung der Inkubationsdauer wurde nur ein Anteil von 56,7 % biotinylierter YTS NK-Zellen nachgewiesen. Die Inkubation in anderen Kultivierungsmedien, die laut Herstellerangaben unterschiedliche Biotinkonzentrationen enthielten, führte teilweise zu leicht verbesserten Biotinylierungsraten. Jedoch war der Anteil toter Zellen aufgrund der fehlenden Adaption an diese Medien unverhältnismäßig hoch, so dass von einer weiteren Kultivierung in diesen abgesehen wurde. Eine mögliche Erklärung für die geringeren Biotinylierungsraten stellt die Aktivität der exogenen BirA dar. Bei der anschließenden Untersuchung der Haltbarkeit der Biotinylierung wurde eine neue Charge BirA verwendet. Ab diesem Zeitpunkt wurden nach einstündiger Inkubation mit 2,5 µg BirA circa 80 % biotinylierte YTS-CD3-ζ-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen nachgewiesen (Abbildung 33). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Anteil von 85 % biotinylierter HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen bei den mit dieser Zelllinie durchgeführten Versuchen. Die geringen Unterschiede zwischen den Zelllinien ergaben sich vermutlich aufgrund der leicht erhöhten Expression des Rezeptors NKp46-KiBAP auf den HEK293T-Zellen (98 %, Abbildung 28) im Vergleich zu den YTS NK-Zellen (90 %, Abbildung 29). Auch bei den YTS NK-Zellen sank der Anteil biotinylierter Zellen nach Ende der Inkubation mit der BirA innerhalb von sieben Stunden ab, jedoch war das Ausmaß nicht so dramatisch wie bei den HEK293T-Zellen. Nach sieben Stunden wiesen immerhin noch 19 % der YTS NK-Zellen eine Biotinylierung auf. Die Halbwertszeit lag bei circa fünf Stunden nach Entfernung der BirA. Die unterschiedlichen Haltbarkeiten der Biotinylierung zwischen YTS NK-Zellen und HEK293T-Zellen ergaben sich vermutlich aus deren genetischen Heterogenität. Mit Hilfe der letzten exogenen Biotinylierungsversuche wurde gezeigt, dass die Biotinylierung NKp46-KiBAP-exprimierender YTS NK-Zellen im hohen Maße möglich ist. Da die Haltbarkeit jedoch nur relativ kurze Zeiträume umfasste, wurde für weiterführende Versuche eine endogene Biotinylierung erwogen.

In mehrere Studien wurde die besondere Eignung einer humanisierten Biotinligase zur endogenen Biotinylierung in humanen Zellen demonstriert (Kimura *et al.*, 2010; Mechold, Gilbert und Ogryzko, 2005). Durch Nukleotidaustausch erfolgte eine Codonoptimierung der prokaryontischen Biotinligase BirA, um eine gesteigerte Expression in humanen Zellen zu erreichen. Aufgrund der aussichtsreichen Ergebnisse dieser Studien wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine humanisierte Biotinligase (HuBirA) verwendet. Dabei konnte zum einen auf die bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierte HEK293T-HuBirA-Zelllinie als auch auf einen Expressionsvektor, der für die HuBirA kodiert, zurückgegriffen werden (3.3.4.1). Mittels lentiviralen Gentransfers wurden zunächst die HuBirA- und

NKp46-KiBAP-koexprimierenden Zelllinien HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro und YTS-HuBirA-Puro-NKp46-KiBAP-EGFP generiert.

In einer anschließenden Western Blot-Analyse wurde die Expression der HuBirA in den YTS NK-Zellen und HEK293T-Zellen erfolgreich nachgewiesen (3.3.4.2), wobei die von den YTS NK-Zellen exprimierte HuBirA vermutlich aufgrund von Glykosylierungen ein leicht höheres Molekulargewicht als die von den HEK293T-Zellen exprimierte HuBirA besaß. Des Weiteren zeigte die densitometrische Auswertung ein um das 6,5-fach erhöhtes Expressionsniveau der HuBirA in den HEK293T-Zellen im Vergleich zu den YTS NK-Zellen (Abbildung 34). Dies ist vermutlich auf die der HuBirA vorangestellten, unterschiedlich starken Promotoren zurückzuführen. Für die Transduktion der bereits etablierten HEK293T-HuBirA-Zellen wurde der retrovirale Expressionsvektor pRev-CMV-HuBirA-Sy, der den pCMV-Promotor enthält und für eine Hygromycin B-Resistenz kodiert, verwendet. Da die mit diesem Vektor transduzierten YTS-CD3- ζ -Zellen während der Selektion mit Hygromycin B aus unbekanntem Gründen immer abstarben, wurde der lentivirale Expressionsvektor pHATrick-HuBirA-Sy-Puro genutzt, der über einen pSFFV U3-Promotor und eine Puromycin-Resistenz verfügt. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsniveaus der HuBirA sind Abweichungen zwischen der endogenen Biotinylierung der YTS NK-Zellen und HEK293T-Zellen möglich. Im Anschluss wurde die über mehrere Monate stabile, homogene Expression von NKp46-KiBAP durchflusszytometrisch sowohl auf den HEK293T-Zellen als auch auf den YTS NK-Zellen belegt (Abbildung 35).

Zunächst wurden die HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen hinsichtlich der endogenen Biotinylierung ihres NKp46-KiBAP-Rezeptors untersucht (3.3.4.3). Die durchflusszytometrische Auswertung ergab einen Anteil von 86 % biotinylierter Zellen nach 24-stündiger Inkubation in frischem DMEM-Komplettmedium (Abbildung 36a). Dieser Anteil wurde durch zusätzliche Biotinzugabe auf nahezu 100 % gesteigert, da nun den HEK293T-Zellen Biotin im Überschuss zur Verfügung stand. Dieses deutlich verstärkte Biotinylierungsniveau wurde durch die Untersuchung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestätigt (Abbildung 36b).

Im Anschluss sollten diese sehr aussichtsreichen Ergebnisse auf die YTS NK-Zellen übertragen werden. Jedoch war der Anteil biotinylierter YTS NK-Zellen, wie bereits bei der exogenen Biotinylierung beobachtet (Abbildung 32), mit 49 % nach 22-stündiger Inkubation in RPMI-Komplettmedium wesentlich geringer als bei den HEK293T-Zellen (Abbildung 37). Allerdings wurde ein Einfluss des Mediums auf die endogene Biotinylierung ausgeschlossen, da die Kultivierung der YTS NK-Zellen in DMEM-Komplettmedium ebenfalls nur einen Anteil von 40 % biotinylierter Zellen nach sich zog. Eine mögliche Ursache für das niedrigere Biotinylierungsniveau wäre die im Vergleich zu den HEK293T-Zellen geringere HuBirA-Expression in den YTS NK-Zellen. Dafür spricht der höhere Anteil biotiny-

lierter YTS NK-Zellen zwischen 56 % und 80% bei der exogenen Biotinylierung. Interessanterweise führte die zusätzliche Gabe von Biotin im Gegensatz zu den HEK293T-Zellen nicht zu einer Verbesserung des Biotinylierungsniveaus, sondern ganz im Gegenteil in beiden verwendeten Medien innerhalb von einer Stunde zu einem vollständigen Verlust der Biotinylierung (Abbildung 37). Da dies bei den HEK293T-Zellen nicht beobachtet wurde, ist dieses Phänomen wahrscheinlich auf den genetischen Hintergrund der YTS NK-Zellen zurückzuführen. Eine andere Ursache könnten in der geringeren HuBirA-Expression der YTS NK-Zellen im Vergleich zu den HEK293T-Zellen liegen. Das Verhältnis HuBirA zu Biotin war somit in den YTS NK-Zellen wesentlich größer, so dass es eventuell zu einer Inhibierung der HuBirA-Aktivität durch die zusätzliche Biotinzugabe kam.

4.3.3 Der neuartige, modulare CAR wurde erfolgreich zusammengebaut

Nachdem gezeigt wurde, dass der Rezeptor NKp46-KiBAP sowohl exogen als auch endogen mit Erfolg biotinyliert werden kann (3.3.3 und 3.3.4), erfolgte im Anschluss die Bindung des PSCA-spezifischen, vollständig biotinylierten Einzelkettenantikörpers α PSCA-BAP (Abbildung 38) über Neutravidin an den ebenfalls biotinylierten Rezeptor (3.3.4.5). Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass es zunächst mit zunehmender Menge des Einzelkettenantikörpers α PSCA-BAP zu einer Steigerung des Anteils zusammengesetzter NKp46-KiBAP- α PSCA-BAP-Rezeptoren kam (Abbildung 39). Bei 5 μ g eingesetzter Proteinmenge α PSCA-BAP wurde jeder zweite biotinylierte NKp46-KiBAP-Rezeptor über Neutravidin mit dem Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP verknüpft. Neutravidin besitzt vier Biotinbindungsstellen (Marttila *et al.*, 2000). Eine größere Proteinmenge α PSCA-BAP führte vermutlich zur Absättigung eines Großteils des Neutravidins und somit, aufgrund besetzter Biotinbindungsstellen, zu einer verringerten Bindung an den NKp46-KiBAP-Rezeptor. Diese Hypothese könnte mittels Western Blot-Analysen der verschiedenen α PSCA-BAP-Neutravidin-Ansätze überprüft werden. Mit zunehmender Anzahl gebundener α PSCA-BAP-Moleküle an ein Neutravidin-Molekül wäre die Detektion von α PSCA-BAP-Neutravidin-Komplexen mit einem steigenden Molekulargewicht zu erwarten.

Mit diesem abschließenden Versuch wurde nachgewiesen, dass ein erfolgreicher Zusammenbau des modular aufgebauten CAR NKp46-KiBAP- α PSCA-BAP auf den YTS NK-Zellen möglich ist. Somit wurde erstmalig in Rahmen dieser Arbeit die flexible Armierung von YTS NK-Zellen am Beispiel des Einzelkettenantikörpers gegen PSCA gezeigt.

4.3.4 Mögliche Optimierungen und weiterführende Arbeiten

In Hinblick auf weiterführende Versuche muss der Anteil von YTS NK-Zellen, die den modular aufgebauten CAR auf ihrer Oberfläche tragen, erhöht werden. Dies ist notwendig, da eine geringe CAR-Expression die ausreichende Aktivierung der Effektorfunktionen modifizierter Immunzellen maßgeblich beeinträchtigt (Kershaw *et al.*, 2006). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde zunächst Neutravidin an den biotinylierten Einzelkettenantikörper im molekularen Verhältnis von 1:1 gebunden. Im Anschluss wurde dieser Ansatz mit den biotinylierten YTS NK-Zellen inkubiert. Zur Optimierung könnten zum einen unterschiedliche molekulare Verhältnisse von Neutravidin zu Einzelkettenantikörper genutzt und deren Einfluss beim Zusammenbau des CAR untersucht werden. Zum anderen sollte überprüft werden, ob die Bindung von Neutravidin an die biotinylierten YTS NK-Zellen und die anschließende Zugabe des Einzelkettenantikörpers einen verbesserten Zusammenbau des CAR zur Folge hat.

Nachdem der modular aufgebaute CAR NKp46-KiBAP- α PSCA-BAP erfolgreich zusammengebaut und in hoher Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert wurde, sollte im nächsten Schritt dessen Funktionalität überprüft werden. Dazu gilt es die bereits mit den CAR NKp46- α PSCA-armierten und CD3- ζ -exprimierenden YTS NK-Zellen generierten, aussichtsreichen Ergebnisse hinsichtlich der spezifischen Zytotoxizität, der IFN- γ -Sekretion und Degranulation nach Kokultivierung mit PSCA-exprimierenden Tumorzellen zu reproduzieren. Somit wäre eine vergleichende Untersuchung der Reaktivität von YTS NK-Zellen, die den modular aufgebauten CAR auf ihrer Oberfläche tragen, mit YTS NK-Zellen, die den konventionellen CAR exprimieren, möglich. Dieser Vergleich war jedoch aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisierbar.

Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage für eine neuartige, CAR-basierte Immuntherapie geschaffen. *In vitro* Untersuchungen im Hauptteil der Arbeit demonstrierten bereits, dass die mit dem CAR NKp46- α PSCA-armierten und gleichzeitig CD3- ζ -überexprimierenden NK-Zellen über ein hohes zytotoxisches Potenzial gegenüber PSCA-exprimierenden Tumorzellen verfügen. Nachfolgende Versuche werden zeigen, ob sich die aussichtsreichen Ergebnisse auch im Tiermodell bestätigen. Des Weiteren wird sich in anschließenden Untersuchungen herausstellen, ob der modular aufgebaute CAR ebenfalls eine spezifische, antitumorale Immunantwort der genetisch modifizierten NK-Zellen auslöst. Damit verbindet sich die Hoffnung, dass die so modifizierten NK-Zellen für eine zukünftige CAR-basierte Tumorimmuntherapie geeignet sind.

5 Zusammenfassung

Bei den konventionellen Krebstherapien kommt es häufig zu einer Wiederkehr des Tumors, da meist einzelne Tumorzellen und abgesiedelte Metastasen im Körper verbleiben. Vor diesem Hintergrund hat die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, die spezifisch die Tumorzellen erkennen und eliminieren und zudem gesunde Körperzellen schonen, eine große Bedeutung in der heutigen Krebsforschung. Eine erfolgsversprechende Strategie ist die Generierung von tumorspezifischen, zytotoxischen Immuneffektorzellen, zum Beispiel T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen, durch die genetische Modifikation mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR). Dabei gibt es bereits weitreichende Studien mit T-Lymphozyten, so dass sich nun das Forschungsinteresse immer mehr auf die NK-Zellen richtet. Im Gegensatz zu CAR-arnierten T-Lymphozyten sind sie in der Lage ihr antitumorales Potenzial nicht nur gegen Antigen-positive sondern auch MHC-Klasse I-negative Tumorzellen zu richten. Mögliche Zielstrukturen der CAR sind tumorassoziierte Antigene, wie das Prostata-spezifische Stammzellantigen (PSCA). Es wird auf über 94 % der humanen primären Prostatakarzinome und deren Knochenmetastasen verstärkt exprimiert, jedoch kaum auf Normalgewebe. PSCA ist somit ideal für eine Immuntherapie geeignet. Die bisher in Studien verwendeten CAR-arnierten NK-Zellen wiesen eine feststehende Spezifität gegenüber einem bestimmten Tumorantigen auf. Allerdings ist die Expression von Tumorantigenen innerhalb des Tumors sehr heterogen oder wird durch Tumorevasionsmechanismen herunterreguliert. Dies begrenzt die Reaktivität CAR-arnierter NK-Zellen. Durch die Generierung eines CAR, dessen Spezifität gegenüber einem Tumorantigen ausgetauscht werden kann, wäre der universelle Einsatz CAR-arnierter NK-Zellen in der adjuvanten Immuntherapie von Tumorerkrankungen möglich.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden die permanente NK-Zelllinie YTS und primäre humane NK-Zellen mittels lentiviralen Gentransfers mit einem PSCA-spezifischen CAR, bestehend aus dem gegen PSCA gerichteten Einzelkettenantikörper α PSCA und dem aktivierenden NK-Zellrezeptor NKp46, arniert. Die generierten NK-Zellen wiesen eine über längere Zeiträume stabile Oberflächenexpression des CAR α PSCA-NKp46 auf. Die Kreuzvernetzung des CAR mit seinem Antigen führte zunächst zu keiner selektiven Immunantwort der CAR-arnierten YTS und primären NK-Zellen gegenüber histogenetisch verschiedenen, PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien. Erst nach gleichzeitiger Überexpression des mit NKp46 assoziierten Signaladaptermoleküls CD3- ζ wurde eine Aktivierung der Effektorfunktionen der YTS NK-Zellen induziert. Dies zeigte sich zum einen in der Expression von CD107a als Degranulationsmarker sowie der Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ . Zum anderen wiesen die CAR-arnierten und CD3- ζ -exprimierenden YTS NK-Zellen eine spezifische Zytotoxizität gegenüber MHC-Klasse I- und PSCA-exprimierenden

Tumorzellen auf. Im anschließenden Teil der Arbeit wurde ein modular aufgebauter CAR generiert, bei dem der Einzelkettenantikörper und folglich die Spezifität gegenüber Tumorantigenen austauschbar ist. Dazu wurden YTS NK-Zellen durch lentiviralen Gentransfer mit dem biotinylierbaren NKp46-NK-Zellrezeptor NKp46-KiBAP modifiziert, der über mehrere Monate stabil auf der Oberfläche exprimiert wurde. Die exogene als auch endogene Biotinylierung des Rezeptors wurde mittels einer Biotinproteinligase demonstriert. Unter Ausnutzung der sehr starken Biotin-Avidin-Bindung wurde die Assoziation mit einem Einzelkettenantikörper nachgewiesen. Dafür wurde exemplarisch der gegen PSCA gerichtete, biotinylierbare Einzelkettenantikörper α PSCA-BAP verwendet.

Diese Arbeit zeigt, dass eine spezifische Erkennung und effiziente Lyse von PSCA-exprimierenden Tumorzellen durch die generierten CAR-armierten NK-Zellen erfolgte, wobei zum ersten Mal NKp46 als Bestandteil eines CAR verwendet wurde. Zudem wurde ein modular aufgebauter CAR generiert, dessen Spezifität gegenüber Tumorantigenen austauschbar ist. Diese neuartige Strategie ermöglicht erstmalig eine flexible Armierung von NK-Zellen und stellt damit einen wesentlichen Vorteil bei der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen dar.

Literaturverzeichnis

- Abate-Daga, D., Lagisetty, K. H., Tran, E., Zheng, Z., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W. R., Miermont, A. M., Teper, Y., Rudloff, U., Restifo, N. P., Feldman, S. A., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. (2014). A Novel Chimeric Antigen Receptor Against Prostate Stem Cell Antigen Mediates Tumor Destruction in a Humanized Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Human Gene Therapy*.
- Alkins, R. D., Burgess, A., Ganguly, M., Francia, G., Kerbel, R. S., Wels, W. S. & Hynynen, K. (2013). Focused Ultrasound Delivers Targeted Immune Cells To Metastatic Brain Tumors. *Cancer research*.
- Alon, R., Bayer, E. A. & Wilchek, M. (1990). Streptavidin contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3 (170), S. 1236–1241.
- Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 1-2 (294), S. 15–22.
- Altman, J. D., Moss, P. A. H., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. & Davis, M. M. (2011). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1 (187), S. 7–9.
- Altvater, B., Landmeier, S., Pscherer, S., Temme, J., Schweer, K., Kailayangiri, S., Campana, D., Juergens, H., Pule, M. & Rossig, C. (2009). 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (15), S. 4857–4866.
- Amara, N., Palapattu, G. S., Schrage, M., Gu, Z., Thomas, G. V., Dorey, F., Said, J. & Reiter, R. E. (2001). Prostate stem cell antigen is overexpressed in human transitional cell carcinoma. *Cancer Research*, 12 (61), S. 4660–4665.
- Ames, E. & Murphy, W. J. (2014). Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 1 (63), S. 21–28.
- Argani, P., Rosty, C., Reiter, R. E., Wilentz, R. E., Murugesan, S. R., Leach, S. D., Ryu, B., Skinner, H. G., Goggins, M., Jaffee, E. M., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E. & Hruban, R. H. (2001). Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*, 11 (61), S. 4320–4324.
- Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A. & Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *European Journal of Immunology*, 9 (31), S. 2680–2689.
- Arnstein, P., Taylor, D. O., Nelson-Rees, W. A., Huebner, R. J. & Lennette, E. H. (1974). Propagation of human tumors in antithymocyte serum-treated mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 1 (52), S. 71–84.
- Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M. & Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *The Cancer Journal from Scientific American* (6 Suppl 1), S. S11–14.
- Augugliaro, R., Parolini, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., Cantoni, C., Nanni, M., Moretta, L., Moretta, A. & Bottino, C. (2003). Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *European Journal of Immunology*, 5 (33), S. 1235–1241.

- Baluna, R. & Vitetta, E. S. (1997). Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*, 2-3 (37), S. 117–132.
- Barker, D. F. & Campbell, A. M. (1981a). The birA gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. *Journal of Molecular Biology*, 4 (146), S. 451–467.
- Barker, D. F. & Campbell, A. M. (1981b). Genetic and biochemical characterization of the birA gene and its product: evidence for a direct role of biotin holoenzyme synthetase in repression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 4 (146), S. 469–492.
- Barry, M. & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews. Immunology*, 6 (2), S. 401–409.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, N.Y.)*, 5428 (285), S. 727–729.
- Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4 (8), S. 921–929.
- Becknell, B. & Caligiuri, M. A. (2005). Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Advances in Immunology* (86), S. 209–239.
- Beelen, D. W., Ottinger, H. D., Ferencik, S., Elmaagacli, A. H., Peceny, R., Trenscher, R. & Grosse-Wilde, H. (2005). Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*, 6 (105), S. 2594–2600.
- Beerens, A. M. J., Rots, M. G., Bermúdez, B., de Vries, E. F. J. & Haisma, H. J. (2008). Secretion of thymidine kinase to increase the effectivity of suicide gene therapy results in the loss of enzymatic activity. *Journal of Drug Targeting*, 1 (16), S. 26–35.
- Beer, T. M. & Bubalo, J. S. (2001). Complications of chemotherapy for prostate cancer. *Seminars in Urologic Oncology*, 3 (19), S. 222–230.
- Benson, D. M., Hofmeister, C. C., Padmanabhan, S., Suvannasankha, A., Jagannath, S., Abonour, R., Bakan, C., Andre, P., Efebera, Y., Tiollier, J., Caligiuri, M. A. & Farag, S. S. (2012). A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 22 (120), S. 4324–4333.
- Berg, M., Lundqvist, A., McCoy, P., Samsel, L., Fan, Y., Tawab, A. & Childs, R. (2009). Clinical Grade Ex Vivo-Expanded Human Natural Killer Cells Upregulate Activating Receptors and Death Receptor Ligands and Have Enhanced Cytolytic Activity against Tumor Cells. *Cytotherapy*, 3 (11), S. 341–355.
- Boissel, L., Betancur, M., Wels, W. S., Tuncer, H. & Klingemann, H. (2009). Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leukemia Research*, 9 (33), S. 1255–1259.
- Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S. & Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of Experimental Medicine*, 2 (204), S. 345–356.
- Bonjour, J.-P. (1985). Biotin in Human Nutrition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1 (447), S. 97–104.
- Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M. & Fehm, H. L. (1997). Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 9 (158), S. 4454–4464.

- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.-K., Lieto, L., Maasho, K., Peña, J., Solana, R. & Coligan, J. E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular Immunology*, 9 (38), S. 637–660.
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L. & Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends in Immunology*, 4 (26), S. 221–226.
- Bourin, P., Mansour, I., Doinel, C., Roué, R., Rouger, P. & Levi, F. (1993). Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. *Chronobiology International*, 4 (10), S. 298–305.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 16 (92), S. 7297–7301.
- Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M. J. & Nutt, S. L. (2004). IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 4 (172), S. 2048–2058.
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. & Levin, S. D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 7 (206), S. 1495–1503.
- Brentjens, R. J. & Curran, K. J. (2012). Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* (2012), S. 143–151.
- Bruch, R. C. & White, H. B. (1982). Compositional and structural heterogeneity of avidin glycopeptides. *Biochemistry*, 21 (21), S. 5334–5341.
- Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J., Ten, R. M. & Leibson, P. J. (1997). Functional Role for Syk Tyrosine Kinase in Natural Killer Cell-mediated Natural Cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 12 (186), S. 1965–1974.
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 3 (112), S. 461–469.
- Carlotto, A., Hogsett, V. L., Maiorini, E. M., Razulis, J. G. & Sonis, S. T. (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*, 9 (31), S. 753–766.
- Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A. & Schmitz, M. (2010). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* (2010), S. 956304.
- Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews. Immunology*, 5 (6), S. 343–357.
- Cerwenka, A. & Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews. Immunology*, 1 (1), S. 41–49.
- Chaiet, L. & Wolf, F. J. (1964). THE PROPERTIES OF STREPTAVIDIN, A BIOTIN-BINDING PROTEIN PRODUCED BY STREPTOMYCETES. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (106), S. 1–5.
- Chandler, C. S. & Ballard, F. J. (1988). Regulation of the breakdown rates of biotin-containing proteins in Swiss 3T3-L1 cells. *The Biochemical Journal*, 3 (251), S. 749–755.

- Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E. (1999a). Molecular biology of biotin attachment to proteins. *The Journal of Nutrition*, 2S Suppl (129), S. 477S–484S.
- Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E. (1999b). The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 9 (24), S. 359–363.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R. & Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 3 (10), S. 230–252.
- Chen, L., Park, S.-M., Tumanov, A. V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J. R., Fu, Y.-X., Romero, I. L., Lengyel, E. & Peter, M. E. (2010). CD95 promotes tumour growth. *Nature*, 7297 (465), S. 492–496.
- Clark, K., Plater, L., Peggie, M. & Cohen, P. (2009). Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I κ B kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 21 (284), S. 14136–14146.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual Review of Immunology* (6), S. 629–662.
- Colombo, M. P. & Trinchieri, G. (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2 (13), S. 155–168.
- Colucci, F., Caligiuri, M. A. & Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews. Immunology*, 5 (3), S. 413–425.
- Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., Yang, L., Carrero, J. A. & Yokoyama, W. M. (2009). Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6 (106), S. 1915–1919.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 11 (22), S. 633–640.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (2001b). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 11 (22), S. 633–640.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2 (14), S. 123–133.
- Cronan, J. E. (1990). Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 18 (265), S. 10327–10333.
- Curti, A., Ruggeri, L., D'Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M. R., Trabanelli, S., Giudice, V., Urbani, E., Martinelli, G., Paolini, S., Fruet, F., Isidori, A., Parisi, S., Bandini, G., Baccarani, M., Velardi, A. & Lemoli, R. M. (2011). Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 12 (118), S. 3273–3279.
- Daugherty, B. L., Zavodny, S. M., Lenny, A. B., Jacobson, M. A., Ellis, R. W., Law, S. W. & Mark, G. E. (1990). The uses of computer-aided signal peptide selection and polymerase chain reaction in gene construction and expression of secreted proteins. *DNA and cell biology*, 6 (9), S. 453–459.
- Davila, M. L., Brentjens, R., Wang, X., Rivière, I. & Sadelain, M. (2012). How do CARs work?: Early insights from recent clinical studies targeting CD19. *Oncoimmunology*, 9 (1), S. 1577–1583.

- Davis, D. M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G. B., Mandelboim, O. & Strominger, J. L. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 26 (96), S. 15062–15067.
- DeLange, R. J. & Huang, T. S. (1971). Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 3 (246), S. 698–709.
- Diamandis, E. P. & Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*, 5 (37), S. 625–636.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Marincola, F. M., Leitman, S. F., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Nahvi, A., Mavroukakis, S. A., White, D. E. & Rosenberg, S. A. (2002). A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 3 (25), S. 243–251.
- Elsamman, E., Fukumori, T., Kasai, T., Nakatsuji, H., Nishitani, M.-A., Toida, K., Ali, N. & Kanayama, H.-O. (2006a). Prostate stem cell antigen predicts tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU international*, 6 (97), S. 1202–1207.
- Elsamman, E. M., Fukumori, T., Tanimoto, S., Nakanishi, R., Takahashi, M., Toida, K. & Kanayama, H.-O. (2006b). The expression of prostate stem cell antigen in human clear cell renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *BJU international*, 3 (98), S. 668–673.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2 (90), S. 720–724.
- Esser, R., Müller, T., Stefes, D., Kloess, S., Seidel, D., Gillies, S. D., Aperlo-Iffland, C., Huston, J. S., Uherek, C., Schönfeld, K., Tonn, T., Huebener, N., Lode, H. N., Koehl, U. & Wels, W. S. (2012). NK cells engineered to express a GD2 -specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 3 (16), S. 569–581.
- Fall, R. R. (1979). Analysis of microbial biotin proteins. *Methods in Enzymology* (62), S. 390–398.
- Fidler, I. J. & Kripke, M. L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science (New York, N.Y.)*, 4306 (197), S. 893–895.
- Flanagan, S. P. (1966). „Nude“, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical Research*, 3 (8), S. 295–309.
- Fliesler, S. J. & Basinger, S. F. (1987). Monensin stimulates glycerolipid incorporation into rod outer segment membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 36 (262), S. 17516–17523.
- Frydecka, I., Boćko, D., Kosmaczewska, A., Ciszak, L. & Morilla, R. (2001). The effect of peripheral blood lymphocyte stimulation on zeta chain expression and IL-2 production in Hodgkin's disease. *British Journal of Cancer*, 10 (84), S. 1339–1343.
- Geiger, K. D., Hendruschk, S., Rieber, E. P., Morgenroth, A., Weigle, B., Juratli, T., Senner, V., Schackert, G. & Temme, A. (2011). The prostate stem cell antigen represents a novel glioma-associated antigen. *Oncology Reports*, 1 (26), S. 13–21.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.

- Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., Nohadani, M., Eklund, A. C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P. A. & Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 10 (366), S. 883–892.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. & Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 3 (195), S. 327–333.
- Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Morton, R. A., Boyce, B. F., DeMayo, F. J., Finegold, M. J., Angelopoulou, R., Rosen, J. M. & Greenberg, N. M. (1996). Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Research*, 18 (56), S. 4096–4102.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 1 (36), S. 59–74.
- Greenberg, N. M., DeMayo, F., Finegold, M. J., Medina, D., Tilley, W. D., Aspinnall, J. O., Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Matusik, R. J. & Rosen, J. M. (1995). Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8 (92), S. 3439–3443.
- Green, N. M. (1975). Avidin. *Advances in Protein Chemistry* (29), S. 85–133.
- Griffin, J. D., Hercend, T., Beveridge, R. & Schlossman, S. F. (1983). Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 6 (130), S. 2947–2951.
- Guyen, H., Konstantinidis, K. V., Alici, E., Aints, A., Abedi-Valugerdi, M., Christensson, B., Ljunggren, H.-G. & Dilber, M. S. (2005). Efficient gene transfer into primary human natural killer cells by retroviral transduction. *Experimental Hematology*, 11 (33), S. 1320–1328.
- Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J., Shintaku, I. P., Dorey, F., Raitano, A., Witte, O. N., Said, J. W., Loda, M. & Reiter, R. E. (2000). Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, 10 (19), S. 1288–1296.
- Hames, B. D. R., D. (1981). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford and Washington D.C. 1981.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 4 (166), S. 557–580.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 1 (100), S. 57–70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 5 (144), S. 646–674.
- Hassan, Y. I. & Zempleni, J. (2006). Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *The Journal of Nutrition*, 7 (136), S. 1763–1765.
- Hecht, M.-L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J. L., Noti, C., Schauer, S., Porgado, A. & Seeberger, P. H. (2009). Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *Journal of Proteome Research*, 2 (8), S. 712–720.
- Hellström, I., Garrigues, U., Lavie, E. & Hellström, K. E. (1988). Antibody-mediated killing of human tumor cells by attached effector cells. *Cancer Research*, 3 (48), S. 624–627.

- Herberman, R. B., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 2 (16), S. 216–229.
- Hersey, P. & Zhang, X. D. (2001). How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2 (1), S. 142–150.
- Hicklin, D. J., Marincola, F. M. & Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*, 4 (5), S. 178–186.
- Hillerdal, V., Ramachandran, M., Leja, J. & Essand, M. (2014). Systemic treatment with CAR-engineered T cells against PSCA delays subcutaneous tumor growth and prolongs survival of mice. *BMC cancer* (14), S. 30.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 1 (114), S. 193–197.
- Horynová, M., Takahashi, K., Hall, S., Renfrow, M. B., Novak, J. & Raška, M. (2012). Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igk in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 2 (81), S. 175–180.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C. & Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 4 (173), S. 1017–1020.
- Howard, F. D., Rodewald, H. R., Kinet, J. P. & Reinherz, E. L. (1990). CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18 (87), S. 7015–7019.
- Howard, P. K., Shaw, J. & Otsuka, A. J. (1985). Nucleotide sequence of the birA gene encoding the biotin operon repressor and biotin holoenzyme synthetase functions of *Escherichia coli*. *Gene*, 3 (35), S. 321–331.
- Howarth, M., Takao, K., Hayashi, Y. & Ting, A. Y. (2005). Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21 (102), S. 7583–7588.
- Igarashi, T., Wynberg, J., Srinivasan, R., Becknell, B., McCoy, J. P., Takahashi, Y., Suffredini, D. A., Linehan, W. M., Caligiuri, M. A. & Childs, R. W. (2004). Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood*, 1 (104), S. 170–177.
- Imai, C., Iwamoto, S. & Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, 1 (106), S. 376–383.
- Kalos, M. & June, C. H. (2013). Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*, 1 (39), S. 49–60.
- Kärre, K. (1995). Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science (New York, N.Y.)*, 5200 (267), S. 978–979.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 6055 (319), S. 675–678.

- Katari, U. L., Keirnan, J. M., Worth, A. C., Hodges, S. E., Leen, A. M., Fisher, W. E. & Vera, J. F. (2011). Engineered T cells for pancreatic cancer treatment. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 9 (13), S. 643–650.
- Kellner, C., Maurer, T., Hallack, D., Repp, R., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Valerius, T., Humpe, A., Gramatzki, M. & Peipp, M. (2012). Mimicking an induced self phenotype by coating lymphomas with the NKp30 ligand B7-H6 promotes NK cell cytotoxicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 10 (189), S. 5037–5046.
- Kershaw, M. H., Westwood, J. A., Parker, L. L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S. A., White, D. E., Wunderlich, J. R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C. C., Yang, J. C., Rosenberg, S. A. & Hwu, P. (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20 Pt 1 (12), S. 6106–6115.
- Kiessling, R., Klein, E. & 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. *European Journal of Immunology*, 2 (5), S. 112–117.
- Kimura, R., Yoda, A., Hayashizaki, Y. & Chiba, J. (2010). Novel ELISA using intracellularly biotinylated antigen for detection of antibody following DNA immunization. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 1 (63), S. 41–48.
- Kinet, J. P. (1992). The gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Current Opinion in Immunology*, 1 (4), S. 43–48.
- Kochenderfer, J. N. & Rosenberg, S. A. (2013). Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 5 (10), S. 267–276.
- Koh, C. Y., Blazar, B. R., George, T., Welniak, L. A., Capitini, C. M., Raziuddin, A., Murphy, W. J. & Bennett, M. (2001). Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood*, 10 (97), S. 3132–3137.
- Kono, K., Rensing, M. E., Brandt, R. M., Melief, C. J., Potkul, R. K., Andersson, B., Petersson, M., Kast, W. M. & Kiessling, R. (1996). Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clinical Cancer Research*, 11 (2), S. 1825–1828.
- Korde, N., Carlsten, M., Lee, M.-J., Minter, A., Tan, E., Kwok, M., Manasanch, E., Bhutani, M., Tajeja, N., Roschewski, M., Zingone, A., Costello, R., Mulquin, M., Zuchlinski, D., Maric, I., Calvo, K. R., Braylan, R., Tembhare, P., Yuan, C., Stetler-Stevenson, M., Trepel, J., Childs, R. & Landgren, O. (2014). A phase II trial of pan-KIR2D blockade with IPH2101 in smoldering multiple myeloma. *Haematologica*, 6 (99), S. e81–83.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *The Journal of Cell Biology*, 4 (115), S. 887–903.
- Kruschinski, A., Moosmann, A., Poschke, I., Norell, H., Chmielewski, M., Seliger, B., Kiessling, R., Blankenstein, T., Abken, H. & Charo, J. (2008). Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45 (105), S. 17481–17486.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 5259 (227), S. 680–685.
- Lanier, L. L. (1998). NK cell receptors. *Annual Review of Immunology* (16), S. 359–393.
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*, 5 (9), S. 495–502.

- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J. & Phillips, J. H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 10 (141), S. 3478–3485.
- Lanier, L. L., Yu, G. & Phillips, J. H. (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*, 6251 (342), S. 803–805.
- Leon-Del-Rio, A. & Gravel, R. A. (1994). Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 37 (269), S. 22964–22968.
- Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R. A. (1995). Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10 (92), S. 4626–4630.
- Leong, J. W., Chase, J. M., Romee, R., Schneider, S. E., Sullivan, R. P., Cooper, M. A. & Fehniger, T. A. (2014). Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 4 (20), S. 463–473.
- Levy, E. M., Roberti, M. P. & Mordoh, J. (2011). Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* (2011), S. 676198.
- Li, L., Liu, L. N., Feller, S., Allen, C., Shivakumar, R., Fratantoni, J., Wolfraim, L. A., Fujisaki, H., Campana, D., Chopas, N., Dzekunov, S. & Peshwa, M. (2010). Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method. *Cancer Gene Therapy*, 3 (17), S. 147–154.
- Li, S. J. & Cronan, J. E. (1992). The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2 (267), S. 855–863.
- Ljunggren, H.-G. & Malmberg, K.-J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, 5 (7), S. 329–339.
- López-Botet, M. & Bellón, T. (1999). Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Current Opinion in Immunology*, 3 (11), S. 301–307.
- Malmberg, K.-J., Beziat, V. & Ljunggren, H.-G. (2012). Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *European Journal of Immunology*, 12 (42), S. 3141–3145.
- Maloney, D. G. (2005). Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets. *Seminars in Oncology*, 1 Suppl 1 (32), S. S19–26.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W. & Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 6823 (409), S. 1055–1060.
- Marttila, A. T., Laitinen, O. H., Airene, K. J., Kulik, T., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (2000). Recombinant Neutralite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties. *FEBS Letters*, 1 (467), S. 31–36.
- Mathé, G., Amiel, J. L., Schwarzenberg, L., Cattani, A. & Schneider, M. (1965). Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Research*, 9 (25), S. 1525–1531.

- McAllister, H. C. & Coon, M. J. (1966). Further Studies on the Properties of Liver Propionyl Coenzyme A Holocarboxylase Synthetase and the Specificity of Holocarboxylase Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 12 (241), S. 2855–2861.
- Mechold, U., Gilbert, C. & Ogryzko, V. (2005). Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of target proteins in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 3 (116), S. 245–249.
- Michaëlsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Kärre, K. & Söderström, K. (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *The Journal of Experimental Medicine*, 11 (196), S. 1403–1414.
- Micucci, F., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. & Galandrini, R. (2006). High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells. *Experimental Hematology*, 10 (34), S. 1344–1352.
- Milani, A., Sangiolo, D., Montemurro, F., Aglietta, M. & Valabrega, G. (2013). Active immunotherapy in HER2 overexpressing breast cancer: current status and future perspectives. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 7 (24), S. 1740–1748.
- Monjazeab, A. M., Zamora, A. E., Grossenbacher, S. K., Mirsoian, A., Sckisel, G. D. & Murphy, W. J. (2013). Immunoediting and Antigen Loss: Overcoming the Achilles Heel of Immunotherapy with Antigen Non-Specific Therapies. *Frontiers in Oncology* (3), URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3724213/>, 02.09.2014.
- Moore, M. L., Teitell, M. A., Kim, Y., Watabe, T., Reiter, R. E., Witte, O. N. & Dubey, P. (2008). Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation. *The Prostate*, 2 (68), S. 139–151.
- Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G. & Münz, C. (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *European Journal of Immunology*, 9 (36), S. 2394–2400.
- Moretta, A., Bottino, C., Millo, R. & Biassoni, R. (1999). HLA-specific and non-HLA-specific human NK receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (244), S. 69–84.
- Morgenroth, A., Cartellieri, M., Schmitz, M., Günes, S., Weigle, B., Bachmann, M., Abken, H., Rieber, E. P. & Temme, A. (2007). Targeting of tumor cells expressing the prostate stem cell antigen (PSCA) using genetically engineered T-cells. *The Prostate*, 10 (67), S. 1121–1131.
- Müller, N. (2013). Generierung und Evaluation von modifizierten NK-Zellen mit SDF-1alpha-Chemotaxis und Reaktivität gegen EGFRVIII-positive Gliomzellen. Dissertation, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
- Müller, T., Uherek, C., Maki, G., Chow, K. U., Schimpf, A., Klingemann, H.-G., Tonn, T. & Wels, W. S. (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 immunology, immunotherapy: CII*, 3 (57), S. 411–423.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science (New York, N. Y.)*, 5203 (267), S. 1449–1456.
- Nikolau, B. J., Wurtele, E. S. & Stumpf, P. K. (1985). Use of streptavidin to detect biotin-containing proteins in plants. *Analytical Biochemistry*, 2 (149), S. 448–453.
- Oberoi, P. & Wels, W. S. (2013). Arming NK cells with enhanced antitumor activity: CARs and beyond. *Oncoimmunology*, 8 (2), S. e25220.
- De Oliveira, S. N., Ryan, C., Giannoni, F., Hardee, C. L., Tremcinska, I., Katebian, B., Wherley, J., Sahaghian, A., Tu, A., Grogan, T., Elashoff, D., Cooper, L. J. N., Hollis, R. P. & Kohn, D. B.

- (2013). Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 10 (24), S. 824–839.
- Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S. & Miyazaki, S. (1996). Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 7 (157), S. 2909–2915.
- Park, T. S., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. (2011). Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends in Biotechnology*, 11 (29), S. 550–557.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J. L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S. R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F. J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R. D. & Foster, D. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 6808 (408), S. 57–63.
- Passalacqua, R., Buzio, C., Buti, S., Porta, C., Labianca, R., Pezzuolo, D., Camisa, R., Sabbatini, R., Benecchi, L., Messina, C., Cengarle, R., Vaglio, A., Dalla Chiesa, M., Tomasello, G. & Caminiti, C. (2010). Phase III, randomised, multicentre trial of maintenance immunotherapy with low-dose interleukin-2 and interferon-alpha for metastatic renal cell cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 4 (59), S. 553–561.
- Pegram, H. J., Jackson, J. T., Smyth, M. J., Kershaw, M. H. & Darcy, P. K. (2008). Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 5 (181), S. 3449–3455.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 10 (190), S. 1505–1516.
- Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V. & Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 5 (130), S. 2133–2141.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R. & Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 5 (188), S. 953–960.
- Ploegh, H. L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science (New York, N.Y.)*, 5361 (280), S. 248–253.
- Porrata, L. F., Inwards, D. J., Micallef, I. N., Johnston, P. B., Ansell, S. M., Hogan, W. J. & Markovic, S. N. (2010). Interleukin-15 affects patient survival through natural killer cell recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphomas. *Clinical & Developmental Immunology* (2010), S. 914945.
- Raff, A. B., Gray, A. & Kast, W. M. (2009). Prostate stem cell antigen: A prospective therapeutic and diagnostic target. *Cancer Letters*, 2 (277), S. 126–132.
- Ramirez, L. Y., Huestis, S. E., Yap, T. Y., Zyzanski, S., Drotar, D. & Kodish, E. (2009). Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents? *Pediatric Blood & Cancer*, 4 (52), S. 497–502.

- Rasheed, S., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Nelson-Rees, W. A. & Arnstein, P. (1977). Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *Journal of the National Cancer Institute*, 4 (58), S. 881–890.
- Reavy, B., Ziegler, A., Diplexcito, J., Macintosh, S. M., Torrance, L. & Mayo, M. (2000). Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expression and Purification*, 2 (18), S. 221–228.
- Reiners, K. S., Kessler, J., Sauer, M., Rothe, A., Hansen, H. P., Reusch, U., Hucke, C., Köhl, U., Dürkop, H., Engert, A. & von Strandmann, E. P. (2013). Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 4 (21), S. 895–903.
- Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Beau, M. M. L., Loda, M. & Witte, O. N. (1998a). Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4 (95), S. 1735–1740.
- Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Beau, M. M. L., Loda, M. & Witte, O. N. (1998b). Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4 (95), S. 1735–1740.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology*, 4 (12), S. 269–281.
- Rigby, C. C. & Franks, L. M. (1970). A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *British Journal of Cancer*, 4 (24), S. 746–754.
- Robinson, B. H., Oei, J., Saunders, M. & Gravel, R. (1983). [3H]biotin-labeled proteins in cultured human skin fibroblasts from patients with pyruvate carboxylase deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 10 (258), S. 6660–6664.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Aebersold, P. M., Linehan, W. M., Seipp, C. A. & White, D. E. (1989). Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annals of Surgery*, 4 (210), S. 474–484; discussion 484–485.
- Rosenberg, S. A. & Mulé, J. J. (1985). Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery*, 3 (98), S. 437–444.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F. & Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 1 (94), S. 333–339.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Martelli, M. F. & Velardi, A. (2001). Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Current Opinion in Hematology*, 6 (8), S. 355–359.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frasson, F., Aversa, F., Martelli, M. F. & Velardi, A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, N.Y.)*, 5562 (295), S. 2097–2100.
- Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 4 (3), S. 388–398.
- Saeki, N., Gu, J., Yoshida, T. & Wu, X. (2010). Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule? *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14 (16), S. 3533–3538.

- Saffran, D. C., Raitano, A. B., Hubert, R. S., Witte, O. N., Reiter, R. E. & Jakobovits, A. (2001). Anti-PSCA mAbs inhibit tumor growth and metastasis formation and prolong the survival of mice bearing human prostate cancer xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5 (98), S. 2658–2663.
- Sakamoto, H., Yoshimura, K., Saeki, N., Katai, H., Shimoda, T., Matsuno, Y., Saito, D., Sugimura, H., Tanioka, F., Kato, S., Matsukura, N., Matsuda, N., Nakamura, T., Hyodo, I., Nishina, T., Yasui, W., Hirose, H., Hayashi, M., Toshiro, E., Ohnami, S., Sekine, A., Sato, Y., Totsuka, H., Ando, M., Takemura, R., Takahashi, Y., Ohdaira, M., Aoki, K., Honmyo, I., Chiku, S., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ohnami, S., Yanagihara, K., Yoon, K.-A., Kook, M.-C., Lee, Y.-S., Park, S. R., Kim, C. G., Choi, I. J., Yoshida, T., Nakamura, Y. & Hirohashi, S. (2008). Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nature Genetics*, 6 (40), S. 730–740.
- Schatz, P. J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 10 (11), S. 1138–1143.
- Scheuermann, R. H. & Racila, E. (1995). CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leukemia & Lymphoma*, 5-6 (18), S. 385–397.
- Schirrmann, T. & 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 Therapy*, 4 (9), S. 390–398.
- Schirrmann, T. & Pecher, G. (2005). Specific targeting of CD33(+) leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leukemia Research*, 3 (29), S. 301–306.
- Shimasaki, N., Fujisaki, H., Cho, D., Masselli, M., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. & Campana, D. (2012). A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies. *Cytotherapy*, 7 (14), S. 830–840.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. (1997). p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 7 (186), S. 1129–1136.
- Smith, P. A., Tripp, B. C., DiBlasio-Smith, E. A., Lu, Z., LaVallie, E. R. & McCoy, J. M. (1998). A plasmid expression system for quantitative in vivo biotinylation of thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 6 (26), S. 1414–1420.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1 (150), S. 76–85.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E. A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L. H., Degli-Esposti, M. A. & Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 4 (42), S. 501–510.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 4 (23), S. 628–633.
- Di Stasi, A., De Angelis, B., Rooney, C. M., Zhang, L., Mahendravada, A., Foster, A. E., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Dotti, G. & Savoldo, B. (2009). T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood*, 25 (113), S. 6392–6402.
- Sun, J. C., Beilke, J. N., Bezman, N. A. & Lanier, L. L. (2011a). Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 2 (208), S. 357–368.

- Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L. & Lanier, L. L. (2011b). NK cells and immune „memory“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 4 (186), S. 1891–1897.
- Sutlu, T., Nyström, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S. E. & Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 10 (23), S. 1090–1100.
- Suzuki, K., Nakazato, H., Matsui, H., Hasumi, M., Shibata, Y., Ito, K., Fukabori, Y., Kurokawa, K. & Yamanaka, H. (2001). NK cell-mediated anti-tumor immune response to human prostate cancer cell, PC-3: immunogene therapy using a highly secretable form of interleukin-15 gene transfer. *Journal of Leukocyte Biology*, 4 (69), S. 531–537.
- Takeda, K. & Dennert, G. (1993). The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *The Journal of Experimental Medicine*, 1 (177), S. 155–164.
- Tassev, D. V., Cheng, M. & Cheung, N.-K. V. (2012). Retargeting NK92 cells using an HLA-A2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Gene Therapy*, 2 (19), S. 84–100.
- Tatsumi, H., Fukuda, S., Kikuchi, M. & Koyama, Y. (1996). Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. *Analytical Biochemistry*, 1 (243), S. 176–180.
- Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N. & Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nature Immunology*, 5 (9), S. 486–494.
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Chen, E. Y., Wood, B. L., Greisman, H. A., Qian, X., James, S. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Lindgren, C. G., Greenberg, P. D., Riddell, S. R. & Press, O. W. (2008). Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 6 (112), S. 2261–2271.
- Tissot, G., Douce, R. & Alban, C. (1997). Evidence for multiple forms of biotin holocarboxylase synthetase in pea (*Pisum sativum*) and in *Arabidopsis thaliana*: subcellular fractionation studies and isolation of a cDNA clone. *The Biochemical Journal* (323 (Pt 1)), S. 179–188.
- Töpfer, K., Kempe, S., Müller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M., Schackert, G. & Temme, A. (2011). Tumor evasion from T cell surveillance. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* (2011), S. 918471.
- Tran, C. P., Lin, C., Yamashiro, J. & Reiter, R. E. (2002). Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Molecular cancer research: MCR*, 2 (1), S. 113–121.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* (47), S. 187–376.
- Tsao, K. L., DeBarbieri, B., Michel, H. & Waugh, D. S. (1996). A versatile plasmid expression vector for the production of biotinylated proteins by site-specific, enzymatic modification in *Escherichia coli*. *Gene*, 1 (169), S. 59–64.
- Urbanska, K., Lanitis, E., Poussin, M., Lynn, R. C., Gavin, B. P., Kelderman, S., Yu, J., Scholler, N. & Powell, D. J. (2012). A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Research*, 7 (72), S. 1844–1852.
- Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S. E., Safi, H., Lakey, D. L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A. & Barnes, P. F. (2002). The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 7 (168), S. 3451–3457.

- Vey, N., Bourhis, J.-H., Boissel, N., Bordessoule, D., Prebet, T., Charbonnier, A., Etienne, A., Andre, P., Romagne, F., Benson, D., Dombret, H. & Olive, D. (2012). A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood*, 22 (120), S. 4317–4323.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. & Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of Experimental Medicine*, 12 (187), S. 2065–2072.
- Wallach, D., Fellous, M. & Revel, M. (1982). Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature*, 5886 (299), S. 833–836.
- Weissman, A. M., Hou, D., Orloff, D. G., Modi, W. S., Seunanez, H., O'Brien, S. J. & Klausner, R. D. (1988a). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24 (85), S. 9709–9713.
- Weissman, A. M., Ross, P., Luong, E. T., Garcia-Morales, P., Jelachich, M. L., Biddison, W. E., Klausner, R. D. & Samelson, L. E. (1988b). Tyrosine phosphorylation of the human T cell antigen receptor zeta-chain: activation via CD3 but not CD2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 10 (141), S. 3532–3536.
- Wente, M. N., Jain, A., Kono, E., Berberat, P. O., Giese, T., Reber, H. A., Friess, H., Büchler, M. W., Reiter, R. E. & Hines, O. J. (2005). Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer. *Pancreas*, 2 (31), S. 119–125.
- Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1990). Introduction to avidin-biotin technology. *Methods in Enzymology* (184), S. 5–13.
- Wilson, K. P., Shewchuk, L. M., Brennan, R. G., Otsuka, A. J. & Matthews, B. W. (1992). Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19 (89), S. 9257–9261.
- Wolf, B., Grier, R. E., Allen, R. J., Goodman, S. I., Kien, C. L., Parker, W. D., Howell, D. M. & Hurst, D. L. (1983). Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 2 (103), S. 233–237.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science (New York, N.Y.)*, 5428 (285), S. 730–732.
- Young, H. A. & Ortaldo, J. (2006). Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell Research*, 1 (16), S. 20–24.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S. & Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 12 (188), S. 2375–2380.
- Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, 5475 (251), S. 547–548.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktivierende und inhibitorische NK-Zellrezeptoren mit ihren Liganden.....	5
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antibiotika.....	20
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.	21
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.	22
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden	22
Tabelle 6: Übersicht der Chemikalien und Substanzen für die zellbiologischen Arbeiten	23
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Enzyme	23
Tabelle 8: Übersicht der Größenstandards.....	24
Tabelle 9: Übersicht der Inhibitoren.....	24
Tabelle 10: Übersicht der kommerziellen Kits.....	25
Tabelle 11: Übersicht der Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten	25
Tabelle 12: Übersicht der Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Arbeiten	26
Tabelle 13: Übersicht der Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten.	27
Tabelle 14: Übersicht der Bakterienkultivierungsmedien	28
Tabelle 15: Übersicht der Zellkulturmedien	28
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für Klonierungsarbeiten.....	29
Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierungen...30	
Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide.....	30
Tabelle 19: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmide.	31
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Software	31
Tabelle 21: Übersicht der speziellen Verbrauchsmittel.....	32
Tabelle 22: Übersicht der verwendeten und erzeugten Zelllinien	32
Tabelle 23: Standardreaktionsansatz mit der DNA-Polymerase Phusion	37
Tabelle 24: Übersicht über die PCR-Bedingung für die DNA-Polymerasen Phusion.	38
Tabelle 25: Standard-Restriktionsansatz für die Restriktionsendonukleasespaltung von DNA.....	39
Tabelle 26: Ansatz für die cDNA-Synthese	41
Tabelle 27: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Gelelektrophorese ...	44
Tabelle 28: Übersicht über die Arbeitsschritte beim immunologischen Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation der NK-Zellaktivität durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wildtypform von NKp46, des generierten CAR α PSCA-NKp46 und des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP.....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung des CAR-Konstrukts NKp46- α PSCA.	59
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klonierung des Kontrollkonstrukts NKp46-CDS.....	60
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Klonierung der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA.....	62
Abbildung 6: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA.....	64
Abbildung 7: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf YTS Wildtyp-NK-Zellen.	65
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Isolation und Aufreinigung von primären humanen NK-Zellen aus dem peripheren Blut.....	66
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse einer CFSE-Färbung von aktivierten, primären humanen NK-Zellen eines gesunden Spenders.	67
Abbildung 10: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression des CAR NKp46- α PSCA und der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA.....	69
Abbildung 11: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf den NK-Zellen von zwei gesunden Spendern	70
Abbildung 12: Nachweis der PSCA-Oberflächenexpression auf humanen Tumorzelllinien	71
Abbildung 13: Nachweis verschiedener Oberflächenmarker auf humanen Tumorzelllinien	73
Abbildung 14: Spezifische Zytotoxizität von YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien.....	74
Abbildung 15: Spezifische Zytotoxizität von primären humanen NK-Zellen eines gesunden Spenders gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien	75
Abbildung 16: IFN- γ -Sekretion von primären humanen NK-Zellen zweier gesunder Spender gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien	77
Abbildung 17: Schematische Darstellung des CD3- ζ -Ketten-Konstrukts	80

Abbildung 18: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression der CD3- ζ -Kette und des CAR NKp46- α PSCA sowie der Kontrollkonstrukte NKp46-CDS, NKp46-CDS-k und NKp46-k- α PSCA auf den YTS NK-Zellen	82
Abbildung 19: Nachweis der CD3- ζ -Expression in den CAR-armierten und mit den Kontrollkonstrukten modifizierten YTS NK-Zellen mittels Western Blot-Analyse.....	83
Abbildung 20: Nachweis der CD3- ζ -Expression in YTS NK-Zellen und primären humanen NK-Zellen dreier gesunder Spender mittels Western Blot-Analyse	84
Abbildung 21: Spezifische Zytotoxizität von CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien	87
Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von YTS und primären humanen NK-Zellen zweier gesunder Spender gegenüber CD16.....	88
Abbildung 23: Hemmung der spezifische Zytotoxizität von CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien	90
Abbildung 24: Vergleich der spezifischen Zytotoxizitäten der CD3- ζ -Kette- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen (CD3- ζ -NKp46- α PSCA) gegenüber PSCA ⁺ -Tumorzelllinien ohne und mit Abdeckung des PSCA auf deren Oberfläche	91
Abbildung 25: Durchflusszytometrischer Nachweis von CD107a auf der Zelloberfläche von CD3- ζ -Ketten- und CAR-koexprimierenden YTS NK-Zellen	92
Abbildung 26: IFN- γ -Sekretion der CD3- ζ und CAR koexprimierenden YTS NK-Zellen gegenüber den <i>per se</i> PSCA-exprimierenden Tumorzelllinien	94
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Klonierung des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP	96
Abbildung 28: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression von NKp46-CDS und NKp46-KiBAP auf HEK293T-Zellen	98
Abbildung 29: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression der CD3- ζ -Kette und des biotinylierbaren Rezeptors NKp46-KiBAP auf den YTS NK-Zellen.	98
Abbildung 30: Durchflusszytometrischer Nachweis der exogenen Biotinylierung der HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen	100
Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung von HEK293T-NKp46-KiBAP-Puro-Zellen	101
Abbildung 32: Durchflusszytometrischer Nachweis der exogenen Biotinylierung der YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro.....	102
Abbildung 33: Durchflusszytometrische Analyse der Haltbarkeit der exogenen Biotinylierung von YTS-CD3- ζ -NKp46-KiBAP-Puro-Zellen	104
Abbildung 34: Nachweis der Biotinligase HuBirA in HEK293T-Zellen und YTS NK-Zellen mittels Western Blot-Analyse	106

Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von NKp46-KiBAP und NKp46-CDS auf den HEK293T- und YTS-HuBirA-Zellen.....	107
Abbildung 36: Durchflusszytometrischer Nachweis der endogenen Biotinylierung der HEK293T-HuBirA-NKp46-KiBAP-Puro.....	108
Abbildung 37: Durchflusszytometrischer Nachweis der endogenen Biotinylierung der YTS-HuBirA-NKp46-KiBAP-EGFP-Zellen	110
Abbildung 38: Durchflusszytometrischer Nachweis der Spezifität des Einzelketten-antikörpers α PSCA-BAP gegenüber PSCA-exprimierenden HEK293T-PSCA-Tumorzellen	111
Abbildung 39: Prozentualer Anteil von YTS NK-Zellen, die den zusammengebauten Rezeptor NKp46-KiBAP- α PSCA-BAP auf der Oberfläche tragen	112

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Primer-Schmelztemperatur	37
Formel 2: Berechnung der Vektor- und Insertmengen für den Ligationsansatz	40
Formel 3: Berechnung der Lebendzellzahl	47
Formel 4: Berechnung der spezifischen Lyse	53

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	„Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“
AL	Arbeitslösung
AML	akute myeloische Leukämie
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAP	Biotinakzeptorpeptid
BCA	Bicinchoninsäure
BCCP	„Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein“
BSA	„Bovine Serum Albumine“
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CMV	Cytomegalievirus
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DISC	„Death Inducing Signaling Complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic Acid“
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EZD	extrazelluläre Domäne
FACS	„Fluorescence-Activated Cell Sorting“
FSC	„Forward Scatter“
FKS	Fötale Kälberserum
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GvH	„Graft-versus-Host“
GvL	„Graft-versus-Leukemia“
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HIV-1	humanes Immundefizienzvirus 1
HLA	„Human Leukocyte Antigen“
hPCoAC	humane Propionyl-Coenzym A-Carboxylase
HRP	„Horse Raddish Peroxidase“

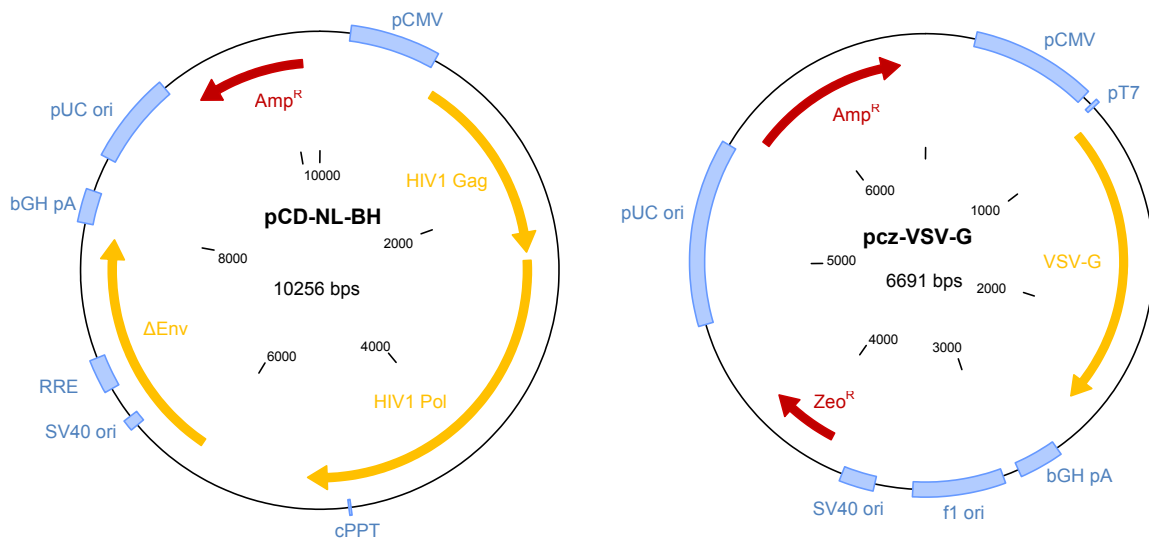
HuBirA	humanisierte, codonoptimierte Biotinproteinligase BirA von <i>E. coli</i>
Hyg ^R	Hygromycin B-Resistenz
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	„ I nternal R ibosomal E ntry S ite“
ITAM	„ I mmunoreceptor T yrosine-based A ctivation M otif“
ITIM	„ I mmunoreceptor T yrosine-based I nhibition M otif“
IZD	intrazelluläre Domäne
Kan ^R	Kanamycinresistenz
KIR	„ K iller cell I mmunoglobulin-like R eceptor“
LAK	„ L ymphokine- A ctivated K iller cells“
LTR	„ L ong T erminal R epeat“
NCR	„ N atural C ytotoxicity R eceptors“
NEA	Nichtessentielle Aminosäure
NKp46	„ N atural K iller cell p46 -related protein“
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NMRI _{nu/nu}	„ N aval M edical R esearch I nstitute“ nude/nude
N-Terminus	Amino-Terminus
MCS	„ M ultiple C loning S ite“
MICA/B	„ M ajor H istocompatibility C omplex C lass I C hain-related A/B “
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MKM-Motiv	konservierte Aminosäuresequenz in prokaryontischen Biotinakzeptorpeptiden aus Methionin (M), Lysin (K) und Methionin (M)
OD	optische Dichte
PBMC	„ P eripheral B lood M ononuclear C ells“
PBS	„ P hosphate B uffered S aline“
PCR	„ P olymerase C hain R eaction“
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PSCA	„ P rostate S tem C ell A ntigen“
pSFFV U3	U3-Promotor des <i>Spleen Focus Forming Virus</i>
Puro ^R	Puromycinresistenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	Poliovirus-Rezeptor
RNA	„ R ibonucleic A cid“
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RGD-Motiv	Erkennungssequenz von Säugetierzellen aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D)
RYD-Motiv	bakterielle Erkennungssequenz aus Arginin (R), Tyrosin (Y) und Asparaginsäure (D)
SCA-2	„ Stem Cell Antigen Type 2 “
SCID-Maus	Maus mit SCID-Mutation („ Severe Combined Immunodeficiency “)
SDS	„ Sodium Dodecyl Sulfate “
SHP	„ Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase “
SL	Stammlösung
SP	murines Igk- Signalpeptid
SSC	„ Side Scatter “
Syk	„ Spleen tyrosine kinase “
T2A	2A -Peptidkonsensusmotiv des <i>Thorea asigna Virus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	„ T Cell Receptor “
TE	Tris-EDTA
Tm	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	„ Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand “
TRAMP	„ Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate “
Tris	Tris (hydroxymethyl)-Aminoethan
ULBP1-4	„ Unique Long 16-Binding Protein 1-4 “
V _H	„ Variable region of the Heavy chain “
V _L	„ Variable region of the Light chain “
VSV-G	Hüllprotein G des <i>Vesicular stomatitis Virus</i>
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
ZAP-70	„ Zeta-chain-Associated Protein kinase 70 “
Zeo ^R	Zeocinresistenz

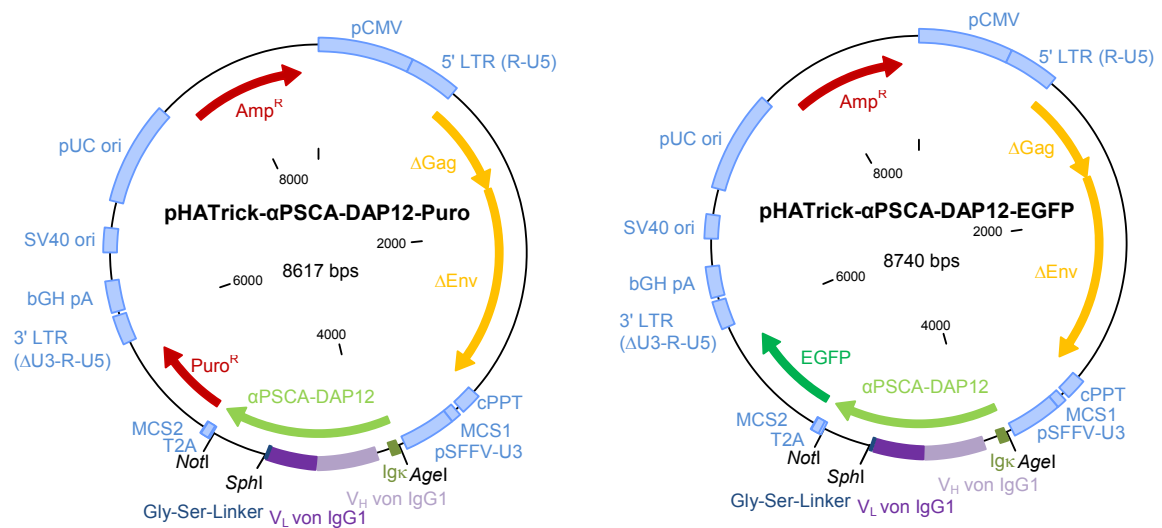
Anhang

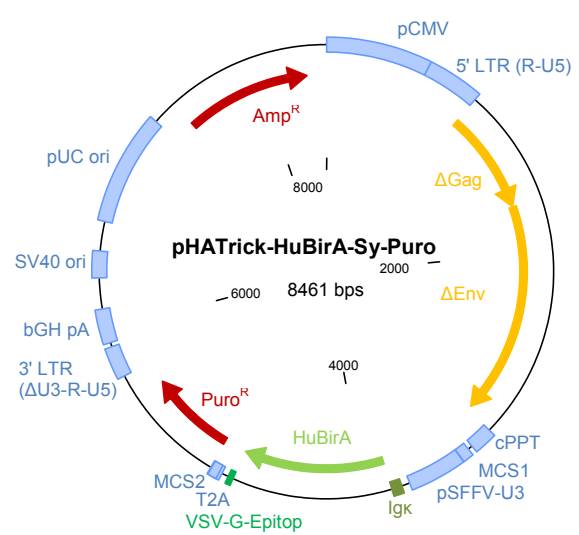
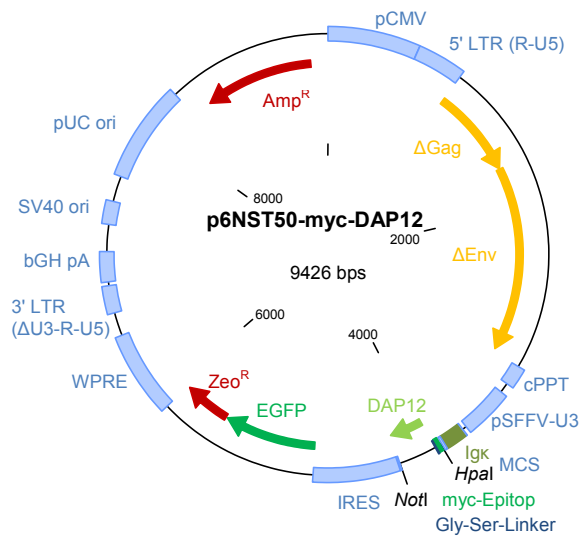
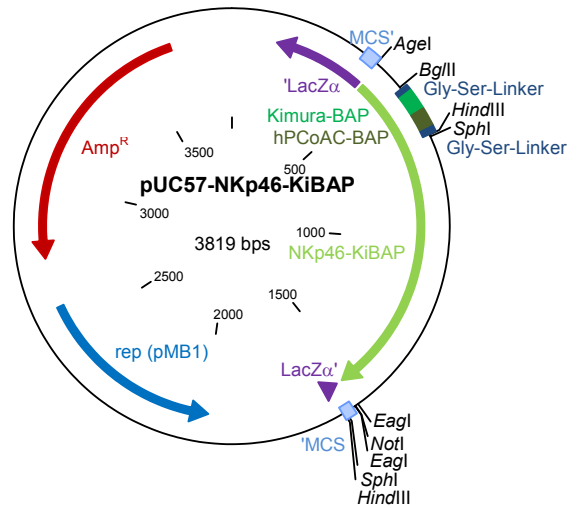
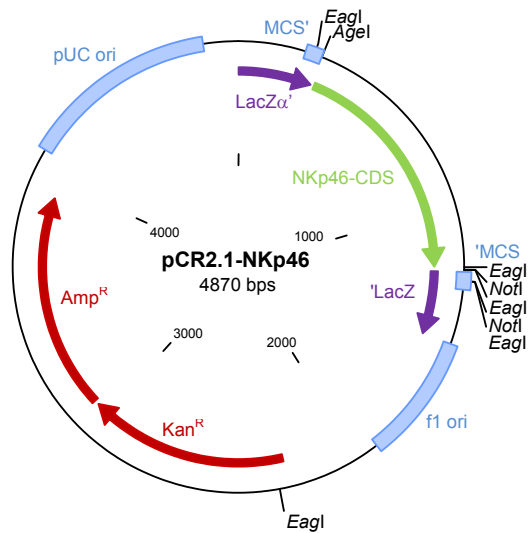
A.1 Vektoren

Verpackungsvektoren zur Generierung viraler Partikel

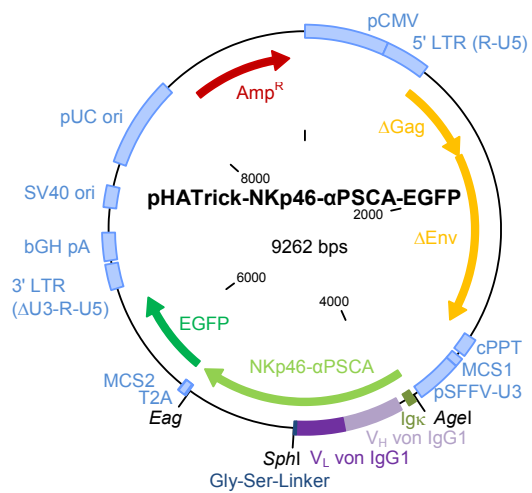
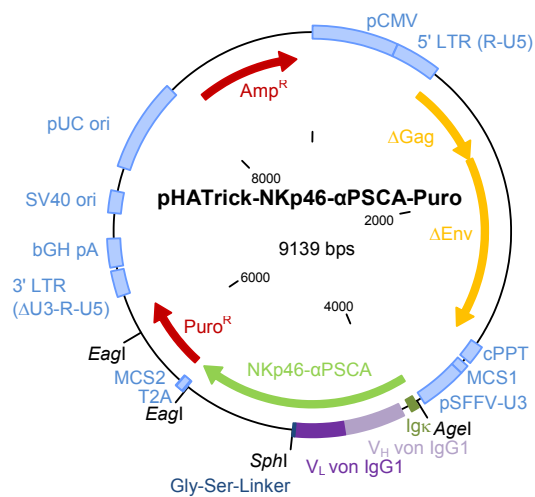


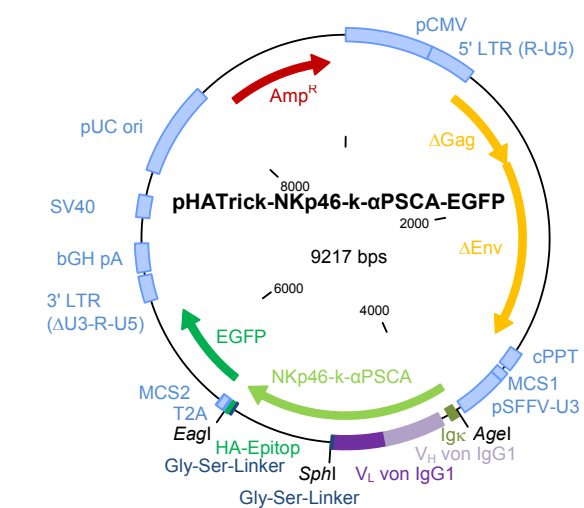
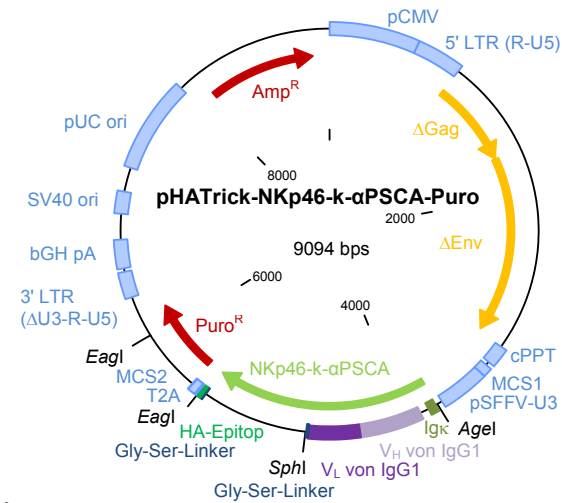
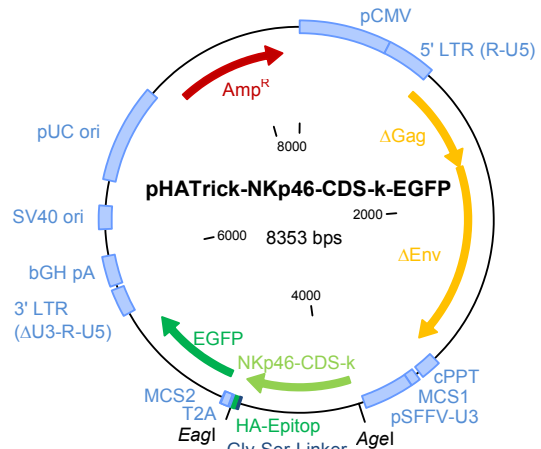
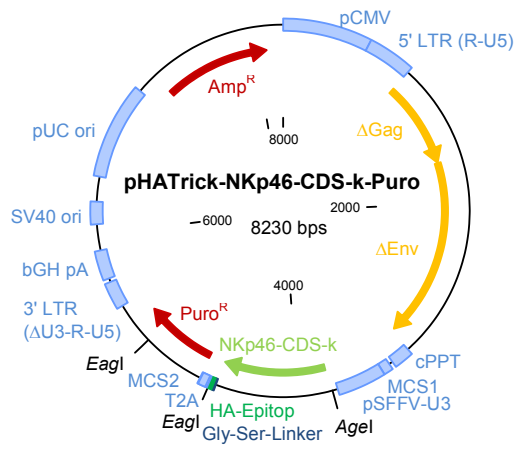
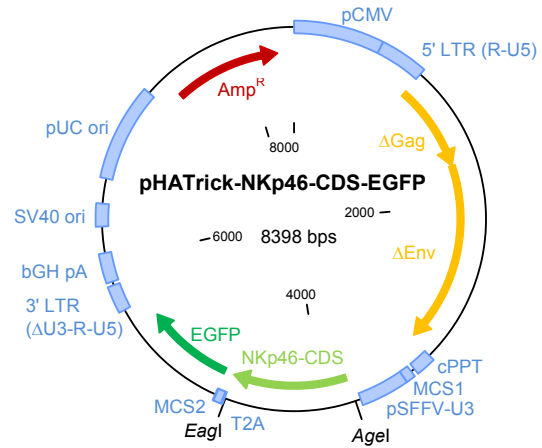
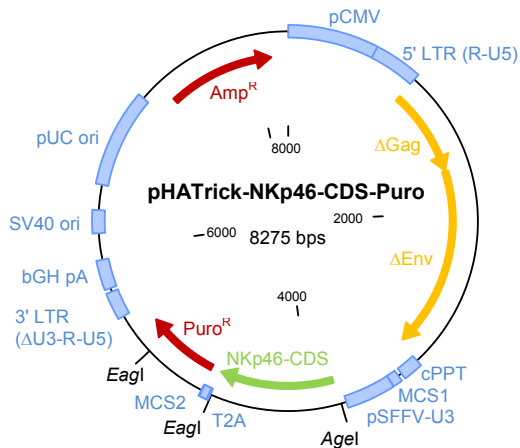
Ausgangsvektoren der Klonierung

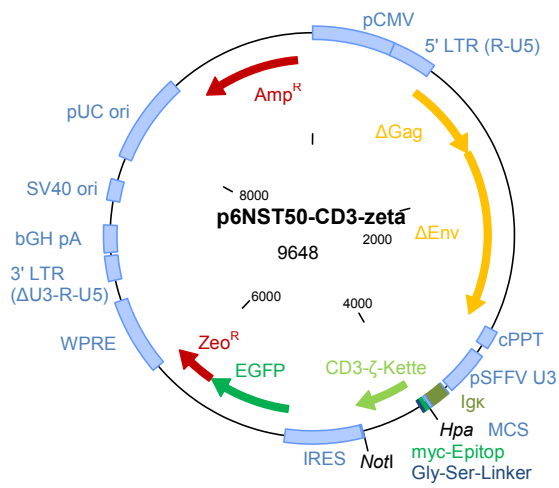
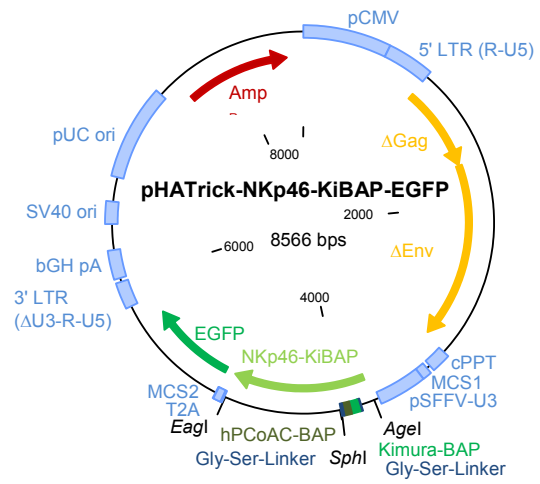
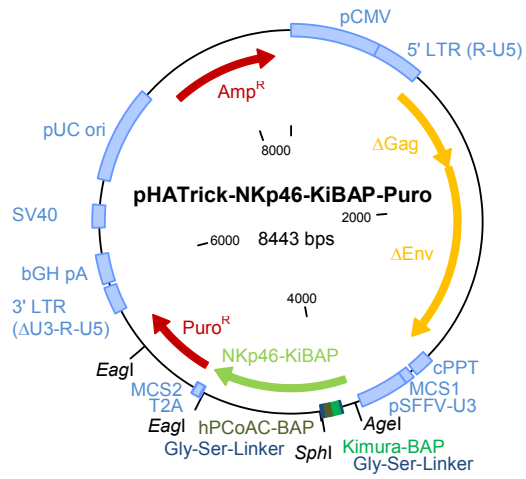




generierte Expressionsvektoren







A.2 Sequenzen

Kodiertes Fusionsprotein NKp46- α PSCA/T2A/Puro^R

murines Ig κ -Signalpeptid, α PSCA, Glycin-Serin-Linker, NKp46, T2A, Puromycinresistenz

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DAAQPARRAR RTKLGTELGS QVKLQESGGG LVQPGGSLKL
 SCVASGFTFS SYTMSWVRRT PEKRLEWVAY IHNGGGHTYY PDTIKGRFTI SRDNAKNTLF
 LEMSSLKSED TAMYYCTRRM YYGNSHWYFD VWGAGTSVTV SSAKTTPPSV YGGGGSGGGG
 SGGGGSTNSD IVMTQSPSSL SASLGDRVTI NCRTSQDISN YLNWYQLTPD GTVKLLIYYT
 LKLN SGVPSR FSGSGSGTDY SLTINNLEKE DFATYFCQQS KTLPWTFGGG TKLEIKRADA
 APTVSGPGGS GGSACKPFIW AEPHFMPKE KQVTICCGN YGAVEYQLHF EGSLFAVDRP
 KPPERINKVK FYIPDMNSRM AGQYSCIYRV GELWSEPSNL LDLVVTEMYD TPTLSVHPGP
 EVISGEKVTF YCRLDTATSM FLLLKEGRSS HVQRGYGVQ AEFPLGPVTT AHRGTYRCFG
 SYNNAHWSFP SEPVKLLVTG DIENSLAPE DPTFPADTWG TYLLTTETGL QKDHALWDHT
 AQNLLRMGLA FLVLVALVWF LVEDWLSRKR TRERASRAST WEGRRRLNTQ TLRPPTPGE
 RGSLLTCGDV EENPGPGTAM TEYKPTVRLA TRDDVPRAVR TLAAAFADYP ATRHTVDPDR
 HIERVTELQE LFLTRVGLDI GKVVVADDGA AVAVWTTPES VEAGAVFAEI GPRMAELSGS
 RLAAQQMEG LLAPHRPKEP AWFLATVGVS PDHQGKGLGS AVVLPGVEAA ERAGVPAFLE
 TSAPRNLPFY ERLGFTVTAD VEVPEGPRTW CMTRKPGA*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46- α PSCA/T2A/EGFP

murines Ig κ -Signalpeptid, α PSCA, Glycin-Serin-Linker, NKp46, T2A, EGFP

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DAAQPARRAR RTKLGTELGS QVKLQESGGG LVQPGGSLKL
 SCVASGFTFS SYTMSWVRRT PEKRLEWVAY IHNGGGHTYY PDTIKGRFTI SRDNAKNTLF
 LEMSSLKSED TAMYYCTRRM YYGNSHWYFD VWGAGTSVTV SSAKTTPPSV YGGGGSGGGG
 SGGGGSTNSD IVMTQSPSSL SASLGDRVTI NCRTSQDISN YLNWYQLTPD GTVKLLIYYT
 LKLN SGVPSR FSGSGSGTDY SLTINNLEKE DFATYFCQQS KTLPWTFGGG TKLEIKRADA
 APTVSGPGGS GGSACKPFIW AEPHFMPKE KQVTICCGN YGAVEYQLHF EGSLFAVDRP
 KPPERINKVK FYIPDMNSRM AGQYSCIYRV GELWSEPSNL LDLVVTEMYD TPTLSVHPGP
 EVISGEKVTF YCRLDTATSM FLLLKEGRSS HVQRGYGVQ AEFPLGPVTT AHRGTYRCFG
 SYNNAHWSFP SEPVKLLVTG DIENSLAPE DPTFPADTWG TYLLTTETGL QKDHALWDHT
 AQNLLRMGLA FLVLVALVWF LVEDWLSRKR TRERASRAST WEGRRRLNTQ TLRPPTPGE
 RGSLLTCGDV EENPGPGTAM VSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG
 KLTLKFICTT GKLVPWPPTL VTTLTYGVQC FSRYPDHMKQ HDFFKSAMPE GYVQERTIFF
 KDDGNYKTRA EVKFEGLTIV NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNYNSHNV YIMADKQKNG
 IKVNFKIRHN IEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LSTQSALS KD PNEKRDMVL
 LEFVTAAGIT LGMDELYK*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-k- α PSCA/T2A/Puro^R

murines Ig κ -Signalpeptid, α PSCA, Glycin-Serin-Linker, NKp46-k, HA-Epitop, T2A, Puromycinresistenz

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DAAQPARRAR RTKLGTELGS QVKLQESGGG LVQPGGSLKL
 SCVASGFTFS SYTMSWVRRRT PEKRLEWVAY IHNGGGHTYY PDTIKGRFTI SRDNAKNTLF
 LEMSSLKSED TAMYYCTRRM YYGNSHWYFD VWGAGTSVTV SSAKTTPPSV YGGGGSGGGG
 SGGGGSTNSD IVMTQSPSSL SASLGDRVTI NCRTSQDISN YLNWYQLTPD GTVKLLIYYT
 LKLN SGVPSR FSGSGSGTDY SLTINNLEKE DFATYFCQQS KTLPWTFGGG TKLEIKRADA
 APTVSGPGGS GGSACKPFIW AEPHFMPKE KQVTICCGN YGAVEYQLHF EGSLFAVDRP
 KPPERINKVK FYIPDMNSRM AGQYSCIYRV GELWSEPSNL LDLVVTEMYD TPTLSVHPGP
 EVISGEKVTF YCRLDTATSM FLLLKEGRSS HVQRGYGVQ AEFPLGPVTT AHRGTYRCFG
 SYNNAWSFP SEPVKLLVTG DIENTSLAPE DPTFPADTWG TYLLTTETGL QKDHALWDHT
 AQNLLRMGLA FLVLVALVWF LVGGSGGSYP YDVPDYARPP TPGEGRGSLL TCGDVEENPG
 PGTAMTEYKP TVRLATRDDV PRAVRTLAAA FADYPATRHT VDPDRHIERV TELQELFLTR
 VGLDIGKVWV ADDGAAVAWV TPESVEAGA VFAEIGPRMA ELSGSRLAAQ QQMEGLLAPH
 RPKEPAWFLA TVGVSPDHQG KGLGSAVVLV GVEAAERAGV PAFLETSA PR NLPFYERLGF
 TVTADVEVPE GPRTWCMTRK PGA*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-k- α PSCA/T2A/EGFP

murines Ig κ -Signalpeptid, α PSCA, Glycin-Serin-Linker, NKp46-k, HA-Epitop, T2A, EGFP

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DAAQPARRAR RTKLGTELGS QVKLQESGGG LVQPGGSLKL
 SCVASGFTFS SYTMSWVRRRT PEKRLEWVAY IHNGGGHTYY PDTIKGRFTI SRDNAKNTLF
 LEMSSLKSED TAMYYCTRRM YYGNSHWYFD VWGAGTSVTV SSAKTTPPSV YGGGGSGGGG
 SGGGGSTNSD IVMTQSPSSL SASLGDRVTI NCRTSQDISN YLNWYQLTPD GTVKLLIYYT
 LKLN SGVPSR FSGSGSGTDY SLTINNLEKE DFATYFCQQS KTLPWTFGGG TKLEIKRADA
 APTVSGPGGS GGSACKPFIW AEPHFMPKE KQVTICCGN YGAVEYQLHF EGSLFAVDRP
 KPPERINKVK FYIPDMNSRM AGQYSCIYRV GELWSEPSNL LDLVVTEMYD TPTLSVHPGP
 EVISGEKVTF YCRLDTATSM FLLLKEGRSS HVQRGYGVQ AEFPLGPVTT AHRGTYRCFG
 SYNNAWSFP SEPVKLLVTG DIENTSLAPE DPTFPADTWG TYLLTTETGL QKDHALWDHT
 AQNLLRMGLA FLVLVALVWF LVGGSGGSYP YDVPDYARPP TPGEGRGSLL TCGDVEENPG
 PGTTMVSKGE ELFTGVVPIL VELDGDVNGH KFSVSGEGEG DATYGKLT LK FICTTGKLPV
 PWPTLVTTLT YGVQCF SRYP DHMKQHDFFK SAMPEGYVQE RTIFFKDDGN YKTRAEVKFE
 GDTLVNRIEL KGIDFKEDGN ILGHKLENY NSHNVYIMAD KQKNGIKVNF KIRHNIEDGS
 VQLADHYQQN TPIGDGPVLL PDNHYLSTQS ALSKDPNEKR DHMVLLFVTT AAGITLGMDE
 LYK*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-CDS/T2A/Puro^R

Signalpeptid von NKp46, NKp46, T2A, Puromycinresistenz

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHF MVP KEKQVTICCO GNYGAVEYQL
 HFEGSLFAVD RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS NLLDLVVTEM
 YDTPTLSVHP GPEVISGEKV TFYCRLDTAT SMFLLLKEGR SSHVQRGYGK VQAEFPLGPV
 TTAHRGTYRC FGSYNNHAW S FPSEPVKLLV TGDIENTSLA PEDPTFPADT WGTYLLTTET
 GLQKDHAWD HTAQNLLRMG LAFVLVVALV WFLVEDWLSR KRTRERASRA STWEGRRRLN
 TQTLRPPTPG EGRGSLTTCG DVEENPGPGT AMTEYKPTVR LATRDDVPRA VRTLAAAFAD
 YPATRHTVDP DRHIERVTEL QELFLTRVGL DIGKVVVADD GAAVAVWTTT ESVEAGAVFA
 EIGPRMAELS GSRLAAQQQM EGLLAPHRPK EPAWFLATVG VSPDHQKGKL GSAVVLPGVE
 AAERAGVPAF LETSAPRNLP FYERLGFVT ADVEVPEGPR TWCMTKPGA *

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-CDS/T2A/EGFP

Signalpeptid von NKp46, NKp46, T2A, EGFP

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHF MVP KEKQVTICCO GNYGAVEYQL
 HFEGSLFAVD RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS NLLDLVVTEM
 YDTPTLSVHP GPEVISGEKV TFYCRLDTAT SMFLLLKEGR SSHVQRGYGK VQAEFPLGPV
 TTAHRGTYRC FGSYNNHAW S FPSEPVKLLV TGDIENTSLA PEDPTFPADT WGTYLLTTET
 GLQKDHAWD HTAQNLLRMG LAFVLVVALV WFLVEDWLSR KRTRERASRA STWEGRRRLN
 TQTLRPPTPG EGRGSLTTCG DVEENPGPGT TMVSKGEELF TGVVPILVEL DGDVNGHKFS
 VSGEGEDAT YGKLT LKFIC TTGKLPVWPW TLVTTLYTYGV QCFSRYPDHM KQHDFFKSAM
 PEGYVQERTI FFKDDGNYKT RAEVKFEGDT LVNRIELKGI DFKEDGNILG HKLEYNYNSH
 NVYIMADKQK NGIKVNFKIR HNIEDGSVQL ADHYQQNTPI GDGPVLLPDN HYLSTQSALS
 KDPNEKRDHM VLLEFVTAAG ITLGMDELYK *

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-CDS-k/T2A/Puro^R

Signalpeptid von NKp46, NKp46-k, Glycin-Serin-Linker, HA-Epitop, T2A, Puromycinresistenz

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHF MVP KEKQVTICCO GNYGAVEYQL
 HFEGSLFAVD RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS NLLDLVVTEM
 YDTPTLSVHP GPEVISGEKV TFYCRLDTAT SMFLLLKEGR SSHVQRGYGK VQAEFPLGPV
 TTAHRGTYRC FGSYNNHAW S FPSEPVKLLV TGDIENTSLA PEDPTFPADT WGTYLLTTET
 GLQKDHAWD HTAQNLLRMG LAFVLVVALV WFLVGGSGGS YPYDVDPYAR PPTPGEGRGS
 LLTCGDVEEN PPGGTAMTEY KPTVRLATRD DVPRAVRTLA AAFADYPATR HTVDPDRHIE
 RVTELQELFL TRVGLDIGKV WVADDGAAVA VWTTPESVEA GAVFAEIGPR MAELSGSRLA
 AQQQMEGLLA PHRPKEPAWF LATVGVSPDH QGKGLGSAVV LPGVEAAERA GVPAFLE TSA
 PRNLPPFYERL GFTVTADVEV PEGPRTWCMT RKPGA*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-CDS-k/T2A/EGFP

Signalpeptid von NKp46, NKp46-k, Glycin-Serin-Linker, HA-Epitop, T2A, EGFP

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPKPF IWAEPHF MVP KEKQVTICQ GNYGAVEYQL
 HFEGSLFAVD RPKPPERINK VKFYIPDMNS RMAGQYSCIY RVGELWSEPS NLLDLVVTEM
 YDTPTLSVHP GPEVISGEKV TFYCRLDAT SMFLLLKEGR SSHVQRGYGK VQAEFPLGPV
 TTAHRGTYRC FGSYNNHAW S FPSEPVKLLV TGDIENTSLA PEDPTFPADT WGTYLLTTET
 GLQKDHAWD HTAQNLLRMG LAFVLVVALV WFLVGGSGGS YPYDVDPYAR PPTPGEGRGS
 LLTCGDVEEN PGP~~GT~~MVSK GEELFTGVVP ILVELDGDVN GHKFSVSGEG EGDATYGLKT
 LKFICTGKL PVPWPTLVTT LTYGVQCF SR YPDHMKQHDF FKSAMPEGYV QERTIFFKDD
 GNYKTRAEVK FEGDTLVNRI ELKGIDFKED GNILGHKLEY NYNSHNVYIM ADKQKNGIKV
 NFKIRHNIED GSVQLADHYQ QNTPIGDGPV LLPDNHYLST QSALSKDPNE KRDHMVLEEF
 VTAAGITLGM DELYK*

Kodierte CD3-ζ-Kette

murines Igk-Signalpeptid, myc-Epitop, Glycin-Serin-Linker, CD3-ζ-Kette

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DAAQPARRAR RTKLGTELGS QVKLQESGGG SGG SACVNEQ
 KLISEEDLNG GSGGSTAAIL QAQLPITEAQ SFGLLDPKLC YLLDGILFIY GVILTALFLR
 VKFSRSAEPP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP R*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-KiBAP/T2A/Puro^RSignalpeptid von NKp46, NKp46-KiBAP, Glycin-Serin-Linker, **Kimura-BAP**, hPCoAC-BAP, T2A, Puromycinresistenz

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPRSGG RGGS **GLNDI** **FEAQKIEWHE** **GAPSSEICVI**
EAMKMQNSMT **AGK**GGSGGRK LACKPFIWAEP HFMVPKEKQ VTICCGNYG AVEYQLHFEG
 SLFAVDRPKP PERINKVKFY IPDMNSRMAGQ YSCIYRVGE LWSEPSNLLD LVVTEMYDTP
 TLSVHPGPEV ISGEKVTFYC RLDATSMFLL LKEGRSSHV QRGYGVQAE FPLGPVTTAH
 RGTYRCFGSY NNHAW SFPSE PVKLLVTGDIE NTSLAPEDP TFPADTWGTY LLTTETGLQK
 DHALWDHTAQ NLLRMGLAFL VLVALVWFLVE DWLSRKRTR ERASRASTWE GRRRLNTQTL
 RPPTPGEGRG SLLTCGDVEE NPGPGTAMTEY KPTVRLATR DDVPRAVRTL AA AFADYPAT
 RHTVDPDRHI ERVTELQELF LTRVGLDIGV WVADDGAAV AVWTTPE SVE AGAVFAEIGP
 RMAELSGSRL AAQQQMEGLL APHRPKEPAWF LATVGVSPD HQGKGLGSAV VLPGVEAAR
 AGVPAFLETS APRNLPFYER LGFTVTADVEV PEGPRTWCM TRKPGA*

Kodiertes Fusionsprotein NKp46-KiBAP/T2A/EGFP

Signalpeptid von NKp46, NKp46-KiBAP, Glycin-Serin-Linker, *Kimura-BAP*, hPCoAC-BAP, T2A, EGFP

MSSTLPALLC VGLCLSQRIS AQQQTLPRSGG RGGSGLNDI **FEAQKIEWHE** **GAPSSEICVI**
EAMKMQNSMT **AGK**GGSGGRK LACKPFIWAEP HFMVPKEKQ VTICCCQNYG AVEYQLHFEG
 SLFAVDRPKP PERINKVKFY IPDMNSRMAGQ YSCIYRVGE LWSEPSNLLD LVVTEMYDTP
 TLSVHPGPEV ISGEKVTFYC RLDTATSMFLL LKEGRSSHV QRGYGKVQAE FPLGPVTTAH
 RGTYRCFGSY NNHAWSPFSE PVKLLVTGDIE NTSLAPEDP TFPADTWGTY LLTTETGLQK
 DHALWDHTAQ NLLRMGLAFL VLVALVWFLVE DWLSRKRTR ERASRASTWE GRRRLNTQTL
 RPPTPG**EGRG** SLLTCGDVEE **NPGPGTAMVSK** **GEELEFTGVV** **PILVELDGDV** **NGHKFSVSGE**
GEGDATYGKL **TLKFICTTGK** **LPVPWPTLVTT** **LYGVQCFS** **RYPDHMKQHD** **FFKSAMPEGY**
VQERTIFFKD **DGNYKTRAEV** **KFEGDTLVNRI** **ELKGIDFKE** **DGNILGHKLE** **YNYNSHNVI**
MADKQKNGIK **VNFKIRHNIE** **DGSVQLADHYQ** **QNTPIGDGP** **VLLPDNHYLS** **TQSALSKDPN**
EKRDMVLE **FVTAAGITLG** **MDELYK***

A.3 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. H. A. Temme angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 2. Oktober 2014

Susanne Michen