Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Aktivierung von natürlichen Killerzellen in einem Kolonkarzinom-Mausmodell

In vivo Aktivität des Immunliganden ULBP2-antiCEA

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Marie Elisabeth Madlener
aus Frankfurt am Main

promoviert am 31. Oktober 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, 2012

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatterin: Frau Professor Dr. rer. nat. E. Pogge von Strandmann

2. Berichterstatterin: Frau Professor Dr. med. vet. A. Sterner-Kock, PhD

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift 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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhangmit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift liegen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 02.01.2012

Marie Elisabeth Madlener

Die in dieser Arbeit angegebenen *in vitro* Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann, Dr. Katrin Reiners und Dr. Janine Kutzsche von mir selbst ausgeführt worden.

Die in dieser Arbeit angegebenen *in vivo* Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Samir Tawadros und Frau Sampurna Chatterjee durchgeführt worden.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann für die großartige Betreuung und Bereitstellung des Themas bedanken. Danke für die vielen Weiterbildungsmöglichkeiten, die ich nutzen konnte. Ich habe aus dem ‚Labor für Immuntherapie' viel mehr mitgenommen, als man der Arbeit entnehmen kann!

Ich danke Katrin für die tolle Unterstützung bei den FACS-Versuchen und Janine für die Hilfestellung bei der Etablierung des Mausmodells. Danke, dass ich immer mit großen und kleinen Fragen zu Euch kommen konnte.

Vielen Dank an Anne, die meine ersten Schritte im Labor begleitet hat und mir immer einen Gedanken voraus war. Danke an Martina, Gisela und Hermann für die vielen Tipps und Tricks und die schönen Stunden im Labor. Danke an Jörg, Dani, Hanna und Jan für den gegenseitigen Austausch. Danke an Hinrich für die vielen Verbesserungsvorschläge bei meinen Probevorträgen.

Danke an Achim und Ron für die gute Zusammenarbeit und Hilfe!

Liebe Maike, für Dich stehe ich auf und winke! Dank Dir hat sich meine Arbeit im Labor auf eine ganz andere Weise ausgezahlt…

Ein besonders großes Dankeschön geht an Samir Tawadros, der mich heldenhaft bei meinen Tierversuchen unterstützt hat und Sampurna Chatterjee, die mir bei den Biolumineszenz-Messungen zur Seite stand, sowie Roland Ullrich, der mir die Messungen ermöglicht hat.

Abschließend gilt mein Dank allen, die meine Arbeit vielfach Korrektur gelesen und meine Vorträge mit mir geübt haben: Vielen Dank für Eure Geduld, ich habe viel von Euch gelernt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IX

1 Einleitung 1

1.1 Immuntherapie 1

1.2 Immunüberwachung im kolorektalen Karzinom 1

1.2.1 Carcinoembryonales Antigen (CEA) 3

1.2.2 Das CEA-transgene Mausmodell 4

1.3 Natürliche Killerzellen 5

1.3.1 Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität 6

1.3.2 Interaktion von NK-Zellen mit anderen Immunzellen 7

1.3.3 Antitumorale NK-Zellantwort 8

1.4 Rekombinante Immunliganden 9

1.5 Fragestellung 10

2 Material und Methodik 13

2.1 Material 13

2.1.1 Zelllinien 13

2.1.2 Mauslinien 13

2.1.3 Antikörper und andere Durchflusszytometrie-Reagenzien 13

2.1.4 Nukleinsäuren 14

2.1.5 Chemikalien 14

2.1.6 Puffer 15

2.1.7 Bakterienkultur 15

2.1.8 Zellkultur 15

2.1.9 Kommerzielle Versuchssysteme 16

2.1.10 Laborgeräte 17

2.2 Methodik 18

2.2.1 Zellbiologische Methoden 18

2.2.2 Molekularbiologische Methoden 21

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden 25

2.2.4 Funktionelle Test 27

2.2.5 *In vivo* Experimente 30

3 Ergebnisse 35

3.1 ULBP2-antiCEA kann in 293T-Zellen exprimiert und aus Zellkulturüberstanden aufgereinigt werden 35

3.2 ULBP2-antiCEA bindet spezifisch an MC38-CEA-Zellen und rekombinanten NKG2D-Rezeptor ... 36
3.3 Etablierung eines *in vivo* Biolumineszenz-Mausmodels ... 38
3.3.1 Luciferase kann in MC38-CEA-Zellen exprimiert und die Luciferase-Aktivität gemessen werden ... 38
3.3.2 MC38-CEA(luc2)-Wachstum kann in CEA transgenen Mäusen mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung detektiert werden ... 39
3.4 Das syngene Mausmodell ... 43
3.4.1 ULBP2-antiCEA aktiviert Lymphozyten *in vivo* ... 44
3.4.2 Geringer Einfluss von ULBP2-antiCEA auf das Tumorwachstum von CEA^+ Tumoren in CEA-transgenen Mäusen ... 47

4 Diskussion ... 49
4.1 Die Behandlung mit ULBP2-antiCEA bewirkt eine Lymphozytenaktivierung *in vivo* ... 49
4.2 Die Behandlung mit ULBP2-antiCEA beeinflusst die NKG2D-Expression nicht ... 51
4.3 ULBP2-antiCEA zeigt nur geringe Effekte auf die Tumorprogression ... 52
4.4 Aussichten: Immuntherapie mit rekombinanten Immunliganden ... 54
4.4.1 NK-zellbasierte Immuntherapie ... 54
4.4.2 Solide Tumore - Erreichbarkeit der Therapie? ... 55
4.4.3 Mögliche Nebenwirkungen der Immuntherapie ... 55
4.5 Weiterführende Versuche ... 56

5 Zusammenfassung ... 59

6 Abstract ... 61

7 Literaturverzeichnis ... 63

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen ... 75

9 Anhang ... 77
9.1 Abbildungsverzeichnis ... 77
9.2 Formelverzeichnis ... 77
9.3 Tabellenverzeichnis ... 78

10 Lebenslauf ... 79

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität *(antibody dependent cellular cytotoxicity)*
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua bidest.	zweifach deionisiertes Wasser
Aqua dest.	einfach deionisiertes Wasser
bp	Basenpaare
BLI	Biolumineszenz-Bildgebung *(bioluminescence imaging)*
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil *(charge-coupled device)*
CD	*cluster of differentiation*
CEA	Carcinoembryonales Antigen *(carcinoembryonic antigen)*
cpm	Zählimpuls pro Minute *(counts per minute)*
d	Tag
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure *(deoxyribonucleic acid)*
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ELISpot	*enzyme linked immuno spot*
FACS	Durchflusszytometrie *(fluorescence activated cell sorting)*
FCS	fötales Kälberserum *(fetal calf serum)*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht *(forward scatter)*
g	Gramm
G	Gauge, Außendurchmesser einer Kanüle
h	Stunde
H_2O	Wasser
IFN	Interferon

IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
IVIS	*in vivo* Bildgebungsverfahren *(in vivo imaging system)*
k	kilo-
l	Liter
luc2	Luciferase 2
m	milli-
M	Molar
MICA	*MHC class I chain related protein A*
MICB	*MHC class I chain related protein B*
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität *(mean fluorescence intensity)*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex *(major histocompatibility complex)*
min	Minute
MULT	*murine ULBP like transcript 1*
µ	mikro-
n	nano-
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	*natural killer group 2 member D*
NKG2DL	NKG2D-Liganden
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NTA	Nitrilotriessigsäure *(nitrilotriacetic acid)*
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	*pacific blue*
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase Kettenreaktion *(polymerase chain reaction)*
p. i.	nach einer Injektion *(post injectionem)*
RAE	*retinoic acid early transcript*
RLU	relative Lichteinheit *(relative light units)*
ROI	*region of interest*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s. c.	subkutan

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht *(sideward scatter)*
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor *(tumor necrosis factor)*
TRAIL	*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*
U	Unit
ULBP	*UL16 binding protein*
ULBP2-BB4	Immunligand mit spezifischen Bindungsstellen für NKG2D und CD138
ULBP2-aCEA	ULBP2-antiCEA, Immunligand mit spezifischen Bindungsstellen für NKG2D und CEA
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor *(vascular endothelial growth factor)*
Vol.	Volumen
v/v	Volumenverhältnisse zweier Flüssigkeiten (Volumen/Volumen)
w/v	Konzentration eines gelösten Stoffes in einer Flüssigkeit (Gewicht/Volumen)
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie

Die Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Tumorzellen wurde erstmals 1957 von Frank Macfarlane Burnet nach dem Grundverständnis von Paul Ehrlich postuliert [8] [38]. Die grundlegende Aufgabe des Immunsystems ist demnach sowohl die Erkennung von ‚selbst' gegenüber ‚fremd', als auch die Unterscheidung zwischen ‚selbst' und ‚transformiert'. Angeborenes und adaptives Immunsystem beeinflussen so die Tumorentstehung [33] [120]. Deshalb führt ein Mangel an immunologischen Schlüsselmolekülen, wie Interferon-γ (IFN-γ) oder Perforin, *in vivo* zu einer erhöhten Inzidenz an chemisch induzierten oder spontan gebildeten Karzinomen [118] [124]. Auch Patienten mit einer angeborenen oder erworbenen Immunschwäche zeigen eine signifikant erhöhte Krebsinzidenz [54].

Tumorzellen können einer Immunantwort über verschiedene Mechanismen entgehen [148]. Sie erzeugen etwa durch die Sekretion von Zytokinen oder die Mutation von Oberflächenantigenen ein Mikromilieu, dass ihre Progression begünstigt [101]. Diese Umgehungsmechanismen (*immune escape*) entstehen erst unter dem Selektionsdruck des Immunsystems [33]. Die Immunselektion führt so zu Tumorzellen, die nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden können. Ziel der Immuntherapie ist es, die malignen Zellen für das Immunsystem wieder sichtbar zu machen und eine tumorspezifische Immunantwort zu induzieren. Außerdem sollen Immuntherapien die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses fördern und so der Entstehung eines Rezidivs vorbeugen [97].

Einzug in den klinischen Alltag konnten bisher vor allem Immuntherapien für hämatoonkologische Patienten finden. Der anti-CD20-Antikörper Rituximab ist hierfür ein prominentes Beispiel [89]. Immuntherapeutische Strategien für solide Tumore, namentlich das kolorektale Karzinom, werden bisher vor allem auf experimenteller Ebene untersucht.

1.2 Immunüberwachung im kolorektalen Karzinom

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Tumorentitäten der Welt [40]. Die chemotherapeutischen Möglichkeiten auf diesem Gebiet sind begrenzt, so dass die radikale

Resektion des Tumors häufig den wichtigsten Prognoseparameter darstellt. In großen Kolonkarzinom-Kohorten konnte nun die Bedeutung des Immunsystems in der Kontrolle der Tumorprogression belegt werden [92]. Dabei interagieren sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems, wie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), als auch Zellen des adaptiven Immunsystems, wie T- und B-Lymphozyten, sowie Gedächtniszellen, mit den Tumorzellen.

Im Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten konnten sogenannte Tumor-infiltrierenden Lymphozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigten Patienten mit einem hohen Anteil an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten ein besseres Gesamtüberleben. Dies ließ sich vor allem für T-Lymphozyten und Gedächtniszellen nachvollziehen [44]. Die Intensität der lokalen Immunzellinfiltration korrelierte stärker mit der Prognose der Patienten als etablierte Kriterien, wie die Ausdehnung des Primärtumors, der Differenzierungsgrad und der Lymphknotenstatus [106]. Desweiteren korrelierte eine hohe Anzahl von T-Lymphozyten im Tumorgewebe mit einer verminderten Metastasierungsrate [97].

Die Anzahl der infiltrierenden NK-Zellen im Kolonkarzinomgewebe scheint einen weiteren prognostischen Marker zu repräsentieren. In fortgeschrittenen Stadien zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl infiltrierender NK-Zellen und dem Überleben der Patienten [23]. Die erhöhte Expression des aktivierenden NK-Zellrezeptors *Natural Killer Group 2 Member D* (NKG2D) nimmt dabei eine zentrale Rolle in der antitumoralen NK-Zellantwort ein [88]. Patienten mit einer erhöhten, präoperativen NK-zellvermittelten Zytotoxizität zeigten außerdem ein vermindertes Auftreten von postoperativen Tumorrezidiven [126].

Ebenso wichtig wie die Effektorfunktion der T-Zellen und NK-Zellen ist offenbar die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Anwesenheit von Gedächtniszellen konnte mit einem längeren, krankheitsfreien Intervall, wie auch einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert werden [44] [97].

Die Etablierung von Immuntherapien im Bereich des kolorektalen Karzinoms erscheint aufgrund der bedeutenden Rolle des Immunsystems in der Tumorkontrolle sehr aussichtsreich. Es existieren eine Vielzahl von experimentellen, immuntherapeutischen Ansätzen, dazu zählen Antikörpertherapien, Vakzinierungsstrategien und T-zellbasierte Therapiekonzepte [1] [28]. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist dabei eine wichtige Zielstruktur. Es wird im Tumorgewebe hoch exprimiert und ist auf gesunder Kolonmukosa nur in geringem Maß nachweisbar. CEA wird von verschiedenen Tumorentitäten gleichermaßen

hoch exprimiert. In dieser Arbeit wurde deshalb das CEA-Protein als Zielstruktur für einen immunologischen Therapieansatz gewählt.

Ein bereits etabliertes Therapieverfahren, das immuntherapeutische Ansätze einbezieht, ist die Therapie mit Bevacizumab, einem monoklonale Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor,* VEGF) [61]. Durch die selektive Bindung an VEGF hemmt Bevacizumab die Angiogenese im Tumorgewebe. Bevacizumab wird in Deutschland mittlerweile zur Erstlinientherapie des metastasierten Kolonkarzinoms in Kombination mit der Standard-Chemotherapie eingesetzt. Der zusätzliche Überlebensvorteil dieses neuen Therapieansatzes ist noch gering [49] [61] [112].

1.2.1 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Die humane CEA-Genfamilie ist Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie und kodiert für zwei unterschiedliche Gruppen von Proteinen, die CEA verwandten Zelladhäsionsproteine (*CEA cell adhesion molecule*, CEACAM) und die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (*pregnancy-specific-glykoproteins*, PSG) [4] [100]. CEACAM sind über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) membrangebunden oder direkt in die Zellmembran integriert, wohingegen PSG ausschließlich sezerniert werden [129]. Die CEACAM-Proteine können in zwei weitere Subgruppen unterteilt werden.

Das CEACAM5-Gen reguliert die Synthese des CEA-Proteins (CD66e) [74]. CEA ist ein 180 kDa großes Glykoprotein, das als interzelluläres Zell-Zell-Adhäsionsmolekül fungiert. Es wird unter physiologischen Bedingungen vor allem auf Zylinderepithel- und Becherzellen des Kolons, aber auch auf muzinöse Zellen des Magens und zu einem geringen Teil auf Zungen-, Ösophagus-, Zervix-, Prostata- und Schweißdrüsenepithelien exprimiert [129]. In gesunder Kolonmuskosa wird CEA nur auf der apikalen, luminalen Zellmembran exprimiert. Es wird in großen Mengen ins Lumen sezerniert und mit dem Stuhl ausgeschieden [71] [75].

Das Carcinoembryonale Antigen wird auf nahezu allen kolorektalen Karzinomen überexprimiert [50]. Eine CEA-Überexpression findet sich auch bei anderen Neoplasien, hauptsächlich dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem Mammakarzinom [64] [114] [131]. Die Überexpression spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und im Metastasierungsprozess. Sie fördert durch die Hemmung der Zelldifferenzierung und Unterbrechung der zellulären Polarität die Tumorentstehung. [5] [18] [62]. Außerdem inhi-

biert überexprimiertes CEA die Apoptoseinduktion bei Verlust der Verankerung an der Extrazellulärmatrix (Anoikis) [96].

Aufgrund seines spezifischen Expressionsprofils eignet sich das CEA-Glykoprotein für immuntherapeutische Zwecke. Einzug in klinische Studien fanden bisher vor allem Tumorvakzine. Verschiedene therapeutische Vakzinierungsstrategien gegen CEA wurden in klinischen Studien getestet. Das Ziel einer Vakzinierung gegen Tumorantigene ist die Induktion einer antitumoralen Immunantwort mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Sicherheit dieser Therapien konnte bereits belegt werden. Die Behandlung wurde in der Regel gut toleriert und es konnten keine schweren Nebenwirkungen festgestellt werden [105] [125]. In der Mehrzahl konnte eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort gegen CEA dokumentiert werden [2] [80] [125]. Die Generierung der Immunantwort resultierte bisher noch nicht in einem Therapieerfolg, allerdings befanden sich die Patienten zum Zeitpunkt der Studien in einem sehr fortgeschrittenen, therapierefraktären Tumorstadium [2] [80] [105] [125].

Die immunologischen Therapieansätze für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms sind vielversprechend. Sie konnten sich allerdings noch nicht gegen Standardtherapieverfahren durchsetzen. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, um erfolgreiche Immuntherapien zu etablieren.

1.2.2 Das CEA-transgene Mausmodell

CEA-transgene Mausmodelle bieten die Möglichkeit, Therapieansätze zur Überwindung der Immuntoleranz gegenüber CEA *in vivo* an immunkompetenten Mäusen zu untersuchen. *In vitro* Ergebnisse können verifiziert und die Effektivität und Sicherheit der Immuntherapie präklinisch evaluiert werden. Das Mausmodell sollte dafür möglichst nah an die humanen Bedingungen angepasst sein. Wichtige Bedingungen für die Etablierung eines geeigneten Tiermodells sind die Immunkompetenz, bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber humanem CEA, und eine gewebsspezifische Expression des humanen CEA-Proteins [19] [20] [34].

In dieser Arbeit wurden eine CEA-transgene, immunkompetente Mauslinie (C57BL/6-CEAtg) und eine CEA-transfizierte, murine Kolonkarzinom-Zelllinie (MC38-CEA) genutzt [20]. Die verwendete CEA-DNA beinhaltet regulatorische Sequenzen, die für eine gewebsspezifische Expression des humanen Proteins in der Maus verantwortlich sind [116]. In der transgenen Maus ist etwa 20 % der Kolonmukosa positiv für CEA. Das Glykoprotein

wird außerdem in den Magenepithelien exprimiert, während in anderen Geweben keine Expression detektiert werden konnte. Damit ist das Expressionsmuster in der transgenen Maus vergleichbar mit der physiologischen Verteilung beim Menschen [129]. CEA kann auch im Stuhl der transgenen Mäuse gemessen werden. Der CEA-Gehalt ist dabei etwa 100fach geringer als beim Menschen. Durch den Polaritätsverlust exprimieren humane kolorektale Karzinome CEA nicht nur auf der apikalen Membran, sondern zu allen Seiten. CEA wird bei Anschluss an das Blutsystem folglich auch ins Serum abgegeben, wo es detektiert und in der Diagnostik als Tumormarker genutzt werden kann [50]. Lösliches CEA kann nicht im Serum der transgenen Mäuse gefunden werden.

Für die murine MC38-CEA-Zelllinie kann *in vitro* und *in vivo* eine stabile CEA-Expression nachgewiesen werden. Die Expressionsrate liegt bei über 90 % *in vitro* und bei Rekultivierung nach *in vivo* Wachstum bei 70 %. Wie beim Menschen ist CEA auf der transfizierten Zelllinie über einen GPI-Linker auf der Membran verankert [59]. Nach der Injektion der MC38-CEA-Zellen in die CEA-transgenen Mäuse entwickeln sich Tumore. Die Mäuse sind tolerant gegenüber CEA, eine Abstoßung kann nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu nicht transgenen Mäusen können nach einer Tumorinokulation keine Antikörper gegen CEA detektiert werden [20].

Das beschriebene CEA-transgene, syngene Mausmodell ist damit ein geeignetes Werkzeug für die immuntherapeutischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine bedeutende Rolle bei der immunologischen Kontrolle von Tumoren [135]. NK-Zellen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie zählen, wie T- und B-Zellen, zu den Lymphozyten. NK-Zellen erkennen virusinfizierte und maligne, transformierte Zellen und können diese ohne eine vorausgegangene Sensibilisierung des Immunsystems eliminieren [78] [121]. Die Lyse der Zielzellen wird hauptsächlich über die Freisetzung von Perforin und Granzymen vermittelt [81]. Perforin integriert sich in die Zellmembran und ermöglicht den Granzymen das Eindringen in die Zelle. Hier können die Granzyme als Apoptose-Initiatoren wirken. NK-Zellen produzieren außerdem Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) [130]. Sie interagieren mit dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen und können somit die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort verstärken oder abschwächen [134].

Bisher wurde eine NK-zellbasierte Therapie vor allem im Rahmen von hämato-onkologischen Krankheitsbildern geprüft [90] [107]. Im Bereich der soliden Tumore zeigten NK-zellbasierte Konzepte bisher nur geringe Erfolge. Die vorliegende Arbeit ist auf dem Gebiet der experimentellen Immuntherapie bei soliden Tumoren angesiedelt und untersucht, ob die therapeutische Stimulation von NK-Zellen eine antitumorale Immunantwort gegenüber kolorektalen Karzinomzellen induzieren kann.

1.3.1 Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität

Die NK-Zellaktivität wird über NK-Zellrezeptoren reguliert. Die Oberflächenrezeptoren interagieren mit Liganden auf den Zielzellen und vermitteln so eine NK-Zellaktivierung oder -hemmung. Verschiedene inhibierende und aktivierende Liganden wurden inzwischen identifiziert, ihr Zusammenspiel ist gut charakterisiert.

Inhibierende NK-Zellrezeptoren erkennen Proteine der Haupthistokompatibilitätskomplex I (*major histocompatibility complex I*, MHC I)-Familie und vermitteln die nötige Selbsttoleranz von NK-Zellen [67]. Bei einer verminderten oder fehlenden MHC I-Expression entfällt die Hemmung und es folgt die NK-zellvermittelte Lyse der Zielzellen [68]. Virusinfizierte oder transformierte Zellen zeigen häufig eine verminderte MHC I-Expression, um einer Immunantwort durch $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen zu entkommen [45] [60] [140]. Im Mausmodell konnten MHC I-defiziente Tumorzelllinien durch NK-Zellen abgestoßen werden [83]. Zu den inhibierenden NK-Zellrezeptoren zählen die KIR-Rezeptoren (*killer cell Ig-like receptors*) beim Menschen, die Ly49-Dimere in der Maus und die CD94-NKG2A-Heterodimere in beiden Spezies [98].

Aktivierende NK-Zellrezeptoren binden Liganden, deren Expression durch Zellstress induziert wird. So kann die NK-zellvermittelte Lyse trotz der Expression von MHC I-Oberflächenmolekülen induziert werden. Zu den aktivierenden NK-Zellrezeptoren zählt die Gruppe der natürlich zytotoxischen Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR). Diese umschließen NKp30, NKp44 und NKp46 [103] [102] [132]. Ein weiterer aktivierender NK-Zellrezeptor ist NKG2D (*natural killer group 2 member D*) [3]. Als humane NKG2D-Liganden (NKG2DL) konnten die MHC I-ähnlichen Moleküle A und B (*MHC class I chain related proteins A and B*), MICA und -B, sowie die UL16 bindenden Proteine (*UL16 binding protein*, ULBP), ULBP1-6, identifiziert werden [3] [16] [24] [35] [36]. In der Maus existieren drei unterschiedliche Gruppen von NKG2DL, die Proteine RAE-1 α-ε (*retinoic acid early transcript*),

das Histokompatibilitäts-Antigen H60 und MULT1 (*murine ULBP like transcript 1*) [9] [14] [87]. NKG2D nimmt eine zentrale Stellung ist der antitumoralen NK-Zellantwort ein [139].

NK-Zellen exprimieren außerdem den niedrigaffinen Fc-Rezeptor CD16, dessen Aktivierung Lyse von Antikörper-markierten Zellen vermittelt (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) [77]. Es konnte gezeigt werden, dass die Effektivität monoklonaler Antikörpertherapien zum Teil auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist [22].

Weiterhin exprimieren NK-Zellen sogenannte Todesliganden, wie TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) oder Fas-Ligand, die mit TNF-Rezeptoren auf Zielzellen interagieren und nach deren Bindung die Apoptose der Zielzelle auslösen können [69] [94]. Die TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose erfolgt unabhängig von inhibierenden oder aktivierenden NK-Zellrezeptoren.

1.3.2 Interaktion von NK-Zellen mit anderen Immunzellen

Die Qualität einer NK-Zellantwort ist neben der Vermittlung über NK-Zellrezeptoren abhängig vom Zytokinmikromilieu. Interleukin-2 (IL-2), IL-12, IL-15, IL-18 und Typ-I-IFN sind wichtige NK-Zellaktivatoren [141]. Außerdem interagieren NK-Zellen mit benachbarten dendritischen Zellen, T-Zellen und Makrophagen und spielen so eine wichtige Rolle bei immunregulatorischen Prozessen. Durch die NK-Zellaktivierung und Interaktion mit Zellen des adaptiven Immunsystems kann eine adaptive, antitumorale Immunantwort getriggert werden und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses erfolgen [134].

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und NK-Zellen nimmt dabei eine zentrale Rolle ein. Dendritische Zellen verstärken über die Sekretion von IL-2, IL-12, IL-15 und IL-18 die NK-Zellproliferation und -zytotoxizität und sichern das Überleben der NK-Zellen [41] [51] [85] [117]. Eine Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen führt *in vivo* zu einer verstärkten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen [43]. Zusätzlich können aktivierte NK-Zellen über die Sekretion von IFN-γ und TNF-α die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen fördern [104] [133]. Gleichzeitig sind NK-Zellen in der Lage unreife, dendritische Zellen zu eliminieren [11] [42] [144]. Ähnliche Interaktionen wurden zwischen NK-Zellen und T-Zellen beschrieben [56]. Über die Sekretion von IFN-γ und TNF-α fördern NK-Zellen direkt die Differenzierung von T-Zellen. Gleichermaßen können NK-Zellen aktivierte T-Zellen töten [135].

Die NK-zellvermittelte Lyse der Zielzellen kann zu einer Antigen-Kreuzpräsentation von dendritischen Zellen an T-Zellen führen und in einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort resultieren [70] [73] [93]. Für Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, der unter anderem zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt wird, konnte gezeigt werden, dass ein Teil der antitumoralen Wirkung des Arzneimittels auf der Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen beruht [6].

1.3.3 Antitumorale NK-Zellantwort

Der Einfluss von NK-Zellen in der Kontrolle der Tumorentwicklung konnte in einer Vielzahl von klinischen und experimentellen Arbeiten gezeigt werden. Eine Langzeitstudie konnte nachweisen, dass Menschen mit anhaltender unterdurchschnittlicher natürlicher zytotoxischer Aktivität, eine signifikant erhöhte Krebsrate aufwiesen [63]. Die antitumorale NK-Zellaktivität ist dabei von der Interaktion zwischen NK-Zellrezeptoren und deren Liganden auf der Tumorzelloberfläche abhängig. So führte die Blockade der inhibitorischen NK-Zellrezeptoren oder die Abwesenheit von MHC I-Oberflächenmolekülen auf den Tumorzellen zu einer gesteigerten NK-Zellantwort *in vivo* [68] [72].

Der NKG2D-Rezeptor nimmt eine zentrale Stellung ist der antitumoralen NK-Zellantwort ein [139]. Es konnte gezeigt werden, dass NKG2D-defiziente Mäuse empfänglicher für chemisch induzierte Tumore sind [55] [122]. Die artifizielle Überexpression von NKG2DL führte hingegen zu einer verstärkten NK-Zellantwort [15] [30]. Weitergehend konnte nachgewiesen werden, dass dieser akuten Immunantwort gegen NKG2DL-exprimierende Tumorzellen eine adaptive Immunantwort folgt [73].

Die Existenz einer NKG2D-abhängigen, antitumoralen Immunantwort konnte auch im Menschen belegt werden. Bei Plasmozytom-Patienten korrelierte eine verminderte NKG2DL-Expression auf den Tumorzellen mit einer verminderten NK-Zellaktivität und einer Tumorprogression [10]. Die zentrale Stellung von NKG2D in der antitumoralen NK-Zellantwort macht den Rezeptor zu einem attraktiven Ziel von Immuntherapien [139]. NKG2D konnte bereits erfolgreich als Zielmolekül zur Rekrutierung von NK-Zellen genutzt werden [46] [47] [65] [136].

Allerdings existieren Mechanismen, die in einer Umgehung der NK-zellvermittelten Immunantwort resultieren. So führt die proteolytische Abspaltung (*shedding*) der NKG2DL auf Tumorzellen zu einer Reduktion der NK-Zellaktivierung über NKG2D [17] [139]. Diese löslichen NKG2DL bewirken eine Herunterregulation von NKG2D auf NK-Zellen [53] [145].

1.4 Rekombinante Immunliganden

In der vorliegenden Arbeit soll NKG2D auf NK-Zellen als Zielstruktur einer experimentellen Immuntherapie dienen. Grundlegende Idee hierbei ist die Bildung einer räumlichen Nähe zwischen NK-Zelle und Tumorzelle. Diese Nähe soll die Ausbildung weiterer Rezeptor-Ligand-Interaktionen ermöglichen, die für die NK-Zellaktivierung und Lyse der Tumorzelle notwendig sind [7]. Nach einer NK-Zellaktivierung soll über die Sekretion von Zytokinen, wie IFN-γ und TNF-α, die Differenzierung und Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen gefördert und eine adaptive Antitumorantwort generiert werden.

Die Vernetzung von Tumor- und NK-Zelle dabei wird über sogenannte ‚Immunliganden' vermittelt. Rekombinante Immunliganden besitzen zwei unterschiedliche Antigenbindungsregionen. Eine Bindungsstelle (ULBP2) bindet spezifisch an NKG2D. Die zweite Bindungsstelle ist spezifisch für ein Antigen auf der Tumorzelloberfläche. Immunliganden ermöglichen so die Quervernetzung von NK-Zellen mit Tumorzellen (Abbildung 1.1). Die Wirksamkeit von Immunliganden konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Der hierfür verwendete Immunligand ULBP2-BB4 bindet mit seinem BB4-Antikörperfragment an CD138, ein Tumorantigen, das auf Plasmozytomzellen überexprimiert wird [29] [137] [143]. ULBP2-BB4 triggert eine NK-zellvermittelte Lyse von $CD138^+$ malignen Zielzellen *in vitro* und hemmt die Tumorprogression *in vivo* [136].

Das Immunliganden-Prinzip kann durch eine Variation der Einzelkettenantikörper gegen spezifische Tumorantigene auf verschiedene Tumorentitäten übertragen werden. Zielstruktur dieser Arbeit ist das CEA-Antigen auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen. Dank seines Expressionsprofils ist das CEA-Antigen eine ideale Zielstruktur für immuntherapeutische Zwecke. Außerdem scheint das Immunsystem in der Kontrolle des kolorektalen Karzinoms eine bedeutende Rolle einzunehmen, so dass ein immunologischer Therapieansatz auf diesem Gebiet vielversprechend ist.

Das in dieser Arbeit verwendete ULBP2-antiCEA-Konstrukt (ULBP2-aCEA) ist ein Fusionsprotein aus einem abgeleiteten Einzelkettenantikörper, der CEA auf Kolonkarzinomzellen detektiert, und ULBP2, das spezifisch an NKG2D bindet. An seinem C-Terminus besitzt das Fusionsprotein ein Tandem-Myc-His-Tag, welches die Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberstand und die Detektion des Proteins in Bindungsversuchen ermöglicht. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigten, dass das ULBP2-aCEA-Fusionsprotein sowohl eine NK-zellvermittelte Tumorzelltötung als auch eine NK-zellabhängige Zytokinsekretion ver-

stärken kann. Das Wachstum von subkutanen Tumoren in Nacktmäusen konnte signifikant vermindert werden, wenn die Mäuse mit einer Kombination aus Immunligand und humanen peripheren Blutlymphozyten behandelt wurden [Rothe et al., Publikation in Vorbereitung].

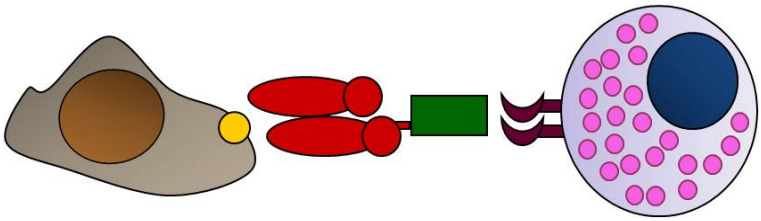

Abbildung 1.1: Wirkmechanismus der Immunliganden.

Die Tumorzelle (grau) trägt das Tumorantigen (gelb) auf der Oberfläche. Der Immunligand hat eine Bindungsstelle für dieses Antigen (rot) und kann gleichzeitig über ULBP2 (grün) an NKG2D (lila) auf der NK-Zelle (blau) binden. Die Vernetzung resultiert in einer NK-zellabhängigen Lyse der Tumorzelle.

1.5 Fragestellung

Die Möglichkeiten zur Behandlung solider Tumore sind begrenzt und die vollständige chirurgische Resektion ist häufig der wichtigste Prognoseparameter. Nach der erfolgreichen Etablierung verschiedener Immuntherapien im Bereich hämatoonkologischer Neoplasien tritt die Immuntherapie nun immer mehr in den Forschungsfokus der Behandlung solider Tumore. Die Bedeutung des Immunsystems bei der Kontrolle der Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms konnte bereits in Studien belegt werden. Daher erscheint die Evaluierung immuntherapeutischer Strategien in diesem Bereich sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit soll die Möglichkeit einer therapeutischen Stimulation autologer NK-Zellen gegenüber Kolonkarzinomzellen in einem syngenen Mausmodell mit Hilfe des Immunliganden ULBP2-antiCEA (ULBP2-aCEA) untersucht werden.

Hierzu soll der Immunligand ULBP2-aCEA, ein Fusionsprotein aus einem CEA-bindenden Anteil zur Erkennung des Tumors und einem NKG2D-bindenden Anteil zur Erkennung von NK-Zellen, in 293T-Zellen transfiziert und in ausreichenden Mengen aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Die spezifische Bindung von ULBP2-aCEA an NKG2D und CEA^+-Zellen wird *in vitro* mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Für die *in vivo* Analyse soll ein syngenes Mausmodell mit CEA-transgenen, immunkompetenten Mäusen (C57BL/6-CEAtg) und einer CEA-transfizierten, murinen Kolonkarzinom-Zelllinie (MC38-CEA) etabliert und die Mäuse nach Anwachsen der Tumore mit dem Immunliganden ULBP2-aCEA behandelt werden.

Die Evaluierung des Therapieerfolgs erfolgt über ein Immunmonitoring (Expression von CD69, CD25, TRAIL und NKG2D auf Immuneffektorzellen) mittels Durchflusszytometrie. Außerdem wird ein möglicher Einfluss der ULBP2-aCEA-Therapie auf die Zellproliferation und die Tumorprogression überprüft. Zur Kontrolle des Tumorwachstums mittels Biolumineszenz-Bildgebung werden die MC38-CEA-Zelllinie im Vorfeld mit einem Luciferase-Gen transfiziert (MC38-CEA(luc2)). Der Ablauf der Versuche in dem Fließschema in Abbildung 1.2 zu entnehmen.

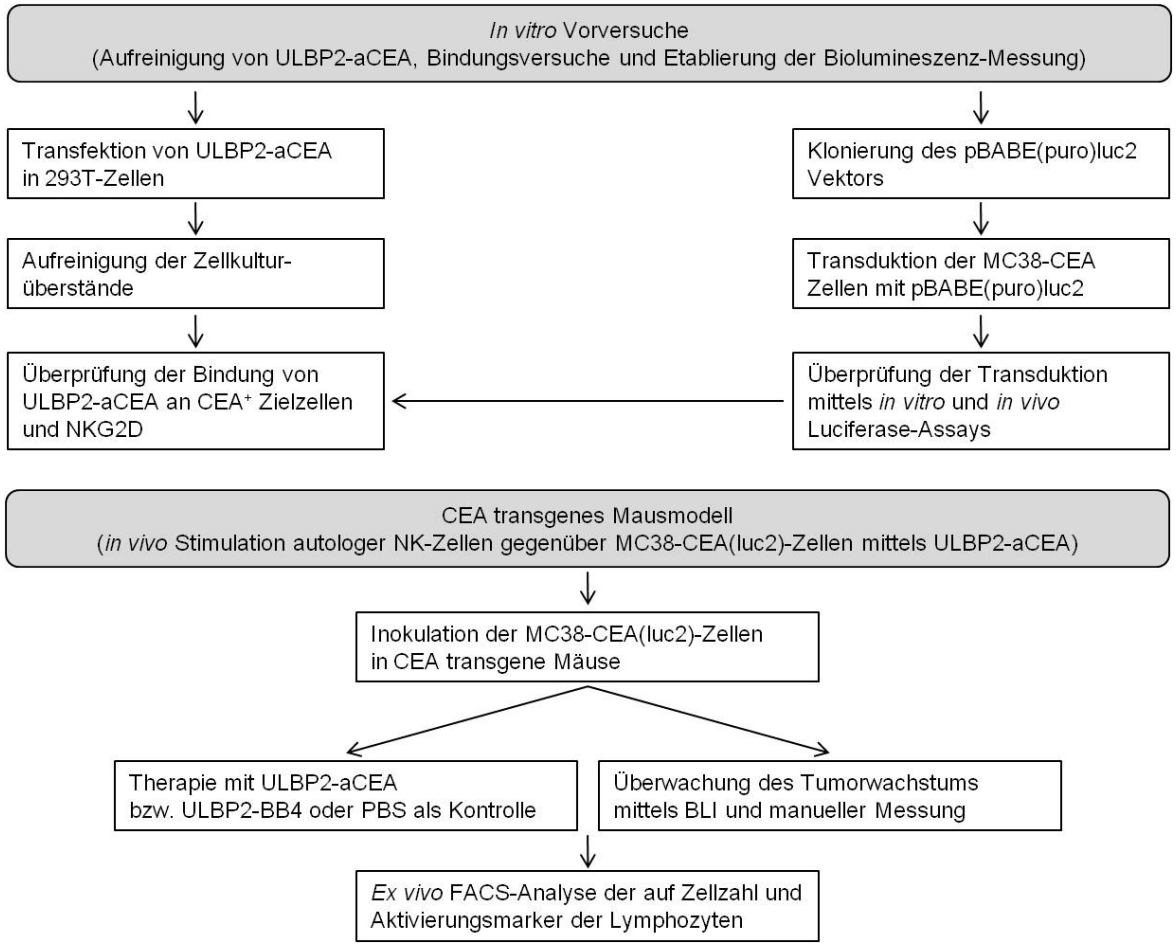

Abbildung 1.2: Fließschema der Versuchsabläufe.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1: Zelllinien

Zelllinie	Erklärung
MC38-CEA	Murine Kolonkarzinomzelllinie stabil transfiziert mit humanem CEA-Antigen[1]
MC38-CEA(luc2)	MC38-CEA stabil transfiziert mit dem Luciferase 2-Gen (luc2)
293T$^{ULBP2\text{-}aCEA}$	Humane embryonale Nierenzelllinie, transfiziert mit ULBP2-antiCEA
Phoenix-Ampho	Retrovirale Verpackungszelllinie (Orbigen, San Diego, USA)

[1] Zur Verfügung gestellt von Paul J. Yazaki, Beckman Research Institute of City of Hope, Kalifornien, USA.

2.1.2 Mauslinien

Tabelle 2.2: Mauslinien

Mauslinie	Erklärung
C57BL/6J-TgN(CE4Ge)18FJP	CEA transgene C57BL/6 Mauslinie (C57BL/6-CEAtg)[2]

[2] Zur Verfügung gestellt von Paul J. Yazaki, Beckman Research Institute of City of Hope, Kalifornien, USA.

2.1.3 Antikörper und andere Durchflusszytometrie-Reagenzien

Tabelle 2.3: Anti-Human-Antikörper

Antikörper	Hersteller
F(ab')2-Fragment-FITC	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
IgG-PE	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

Tabelle 2.4: Anti-Maus-Antikörper

Antikörper	Hersteller
CD25-APC Cy7	Biolegend, San Diego, USA
CD3-FITC	Biolegend, San Diego, USA
CD45-PB	Biolegend, San Diego, USA
CD69-PE Cy7	Biolegend, San Diego, USA
NK1.1-APC	Biolegend, San Diego, USA
NKG2D-PE	Biolegend, San Diego, USA
TRAIL-PE	Biolegend, San Diego, USA

Tabelle 2.5: Weitere Durchflusszytometrie-Reagenzien

Reagenz	Hersteller
NKG2D-Fc	R&D Systems, Minneapolis, USA
7-AAD	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

Tabelle 2.6: Isotypen

Isotypen	Hersteller
Iso-Armenian Hamster Ig-PE	Biolegend, San Diego, USA
Iso-Armenian Hamster Ig-PE Cy7	Biolegend, San Diego, USA
Iso-Rat IgG1-APC Cy7	Biolegend, San Diego, USA
Iso-Rat IgG2A-PE	Biolegend, San Diego, USA

2.1.4 Nukleinsäuren

Tabelle 2.7: Plasmide

Plasmide	Hersteller
pBabe(puro)	Cell Biolabs, San Diego, USA
pGL4.30luc2	Promega, Mannheim

2.1.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Amershan (München), Baxter (Unterschleißheim), Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe),

Sigma-Aldrich (München), Synchem (Felsberg/Altenburg) und Thermo Scientific (Bonn) erworben.

2.1.6 Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt. Der SDS/DTT-Laufpuffer, sowie der PBS-Puffer wurden nach den Angaben aus ‚Molecular Cloning: A Laboratory Manual' von J. Sambrook und D. W. Russell angesetzt [113].

Tabelle 2.8: ACK-Puffer

Reagenz	Zusammensetzung	
NH_4Cl	150	mM
$KHCO_3$	1	mM
DTA	0,1	mM

Tabelle 2.9: FACS-Puffer[3]

Reagenz	Zusammensetzung	
Natriumazid	0,2	%
BSA	0,2	%

[3] *mit PBS angesetzt*

2.1.7 Bakterienkultur

Alle Bakterienkulturmedien und -zusätze wurden von der Firma BD Bioscience (Franklin Lakes, USA) bezogen. Das LB-Medium, das 2 x YT-Medium, sowie die LB-Agarplatten wurden nach den Angaben aus ‚Molecular Cloning: A Laboratory Manual' von J. Sambrook und D. W. Russell angesetzt hergestellt [113].

2.1.8 Zellkultur

Die Zellkulturmedien und -zusätze wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), PAA Laboratories (Pasching, Österreich) und Sigma (München) bezogen.

Tabelle 2.10: 293T-Medium

Reagenz	Zusammensetzung	
Zeocin	200	µg/ml
Mercaptoethanol	1	mM
Penicillin	50	U/ml
Streptomycin	50	µg/ml

Tabelle 2.11: DMEM-Medium

Reagenz	Zusammensetzung	
FCS (Hitze inaktiviert)	10	%
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	µg/ml

Tabelle 2.12: RPMI-Medium

Reagenz	Zusammensetzung	
FCS (Hitze inaktiviert)	10	%
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	µg/ml

2.1.9 Kommerzielle Versuchssysteme

Tabelle 2.13: Kommerzielle Versuchssysteme

Kommerzielles Versuchssystem	Hersteller
Gelelution (Gel Extraction Kit GeneJet)	Fermentas, St. Leon-Rot
Maxipräparation (NucleoBond Xtra Plasmid DNA Purification Kit)	Machery-Nagel, Düren
Minipräparation (GeneJet Plasmid Miniprep Kit)	Fermentas, St. Leon-Rot
PCR-Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit)	Qiagen, Hilden
Proteinaufreiningung (Nickel-QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System)	Qiagen, Hilden
Proteinbestimmung (BCA Protein Assay)	Pierce, Bedford, USA
Transfektion (Metafectene Easy Kit)	Biontex, Martinsried

2.1.10 Laborgeräte

Tabelle 2.14: Zellkulturgeräte

Zellkulturgerät	Hersteller
Brutschrank (Hera cell)	Heraeus Instruments, Hanau
Bakterieninkubator (Kelvitron)	Heraeus Instruments, Hanau
Bakterienschüttler (Innova 4300)	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Sterile Werkbank (Hera safe)	Heraeus Instruments, Hanau

Tabelle 2.15: Elektrophoresegeräte

Elektroporesegeräte	Hersteller
Horizontale Agarose-Gelelektrophorese-Apparaturen	VWR, Darmstadt
Vertikale Minigelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad Laboratories, München
Stromversorgung (Power-Supply)	Biometra, Göttingen
	Bio-Rad Laboratories, München

Tabelle 2.16: Analysegeräte

Analysegerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
	FACS Gallios	Beckman Coulter, Brea, USA
Luminometer	LB96V Microlumat plus	Berthold Technologies, Bad Wildbad
	Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PCR-Gerät	Thermocyler 3000	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	µQuant	BioTek, Winooski, USA
Spektralphotometer	Smart Spec 3000	Bio-Rad Laboratories, München
In vivo imaging system	Photon Imager	Biospace Lab, Paris, Frankreich

2.2 Methodik

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert. Die murine MC38-CEA-Zelllinie wurde in angereichertem RPMI 1640-Nährmedium kultiviert. Die transfizierte, humane embryonale Nierenzelllinie 293T wurde in angereichertem CD293-Medium kultiviert. Die retrovirale Verpackungszelllinie Phoenix-Ampho wurde in angereichertem DMEM-Kulturmedium kultiviert. Die Zusammensetzung der Medien ist Tabelle 2.10 bis Tabelle 2.12 zu entnehmen. Alle Arbeiten an nicht geschlossenen Kulturgefäßen fanden zum Schutz vor Kontamination an einer sterilen Werkbank statt.

Zur Zellpassage der adhärent wachsenden Zellen wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,5 % Trypsin-EDTA trypsiniert. Die Zellen wurden mit 10 ml Medium gewaschen und für 5 min bei 260 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Medium resuspendiert und mit frischem Medium wieder in Kultur gebracht. Bei einfacher Kultivierung wurden die Zellen im Abstand von 3-4 d im Verhältnis 1:10-1:20 (v/v) passagiert. Die transfizierten 293T-Zellen ($293T^{ULBP2\text{-}aCEA}$) wuchsen als Suspensionszellen. Das ULBP2-antiCEA-Konstrukt (ULBP2-aCEA) wurde von den Zellen in den Überstand sezerniert. Im Abstand von 3-4 d wurden die Zellen für 5 min bei 260 g abzentrifugiert und der Überstand bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 (v/v) passagiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die homogene Zellsuspension mit 0,5 % Trypanblaulösung gemischt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Inversmikroskop ausgezählt, so dass die Zellzahl/ml anhand der Formel 2.1 berechnet werden konnte.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Gezählte Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Formel 2.1: Formel zur Berechnung der Zellzahl.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Nicht ständig kultivierte Zellen wurden bei -156 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 70-80 % konfluente Zellen für 5 min bei 260 g abzentrifugiert und das Zellpellet in der gewünschten Menge Einfriermedium (90 % hitzeinaktiviertes FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Es wurden je 1-2 x 10^7 Zellen/ml eingefroren. Die Zellsuspension wurde in sterile 1,8 ml Kryoröhrchen überführt und direkt auf Eis gestellt. Die Zellen wurden für 1 h bei -20 °C und anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren. Zur dauerhaften Kryokonservierung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37 °C aufgetaut, anschließend sofort in 5 ml RPMI-Kulturmedium überführt und für 5 min bei 260 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Zellzahl in der gewünschten Menge Medium resuspendiert und wieder in Kultur gebracht.

2.2.1.3 Transfektion

Am Vortrag der Transfektion wurden 8 x 10^5 Zellen in 2 ml RPMI-Kulturmedium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Zellen mittels Metafectene Easy Kit (Biontex, Martinsried) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Hierzu wurden 12 µl der Metafectene Easy-Transfektionsreagenz in 240 µl Easy Puffer mit 4 µg der Plasmid-DNA versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das RPMI-Kulturmedium der Zielzellen abgenommen und durch frisches RPMI-Medium ersetzt. Das Endvolumen, nach Zugabe der Lipoplexlösung, betrug 2 ml. Nach einer Inkubation von 24-48 h bei 37 °C konnten die Zellen geerntet und für weitere Versuche verwendet werden (transiente Transfektion). Die stabile Transfektion erfolgte analog zur transienten Transfektion. Nachdem die Zellen in den Vertiefungen der 6-Loch-Platten 80-90 % Konfluenz zeigten, wurden sie in 25 cm^2 Kulturflaschen mit 5-10 ml RPMI-Kulturmedium umgesetzt. Am folgenden Tag wurde dem Kulturmedium das entsprechende Selektionsantibiotikum, je nach Resistenzgen im transfizierten Plasmid, zugesetzt. Unter dem Selektionsdruck überleben nur Zellen, bei welchen sich die eingebrachte DNA erfolgreich in das Genom integriert hat.

2.2.1.4 Retrovirale Transduktion

Für die retrovirale Transduktion wurde die amphotrope Verpackungszelllinie Phoenix-Ampho genutzt. Als retroviraler Vektor wurde das pBABE(puro)-Plasmid verwendet, in

welches das Luciferase-Gen kloniert wurde (pBABE(puro)luc2). Der Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion der bakteriellen Transformation und ein Puromycin-Resistenzgen für die Selektion der transduzierten Zielzellen. Die Phoenix-Ampho-Zellen wurden mittels Metafectene Easy Kit (Biontex, Martinsried) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden die Phoenix-Zellen passagiert, so dass sie am nächsten Tag eine 70 %ige Konfluenz in einer 80 cm^2 Kulturflasche zeigten. Zur Transfektion wurden 70 µl der Metafectene Easy-Transfektionsreagenz in 350 µl Easy Puffer mit 23 µg der pBABE(puro)luc2-DNA versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der Phoenix-Zellen durch frisches RPMI-Medium ersetzt. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die adhärenten Zellen gegeben. Nach 65 h wurde das verbrauchte Kulturmedium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Nach weiteren 24 h wurde der retrovirale Überstand vorsichtig abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert. Die retroviralen Überstände wurden sofort zur Infektion der Zielzellen eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Am Tag vor der Transduktion der MC38-CEA-Zellen wurden 3 x 10^5 Zellen in 5 ml RPMI-Kulturmedium in eine 80 cm^2 Kulturflasche ausgesät. Zur Transduktion wurde das Medium der Zielzellen abgenommen, die Zellen mit 1 ml frischem RPMI-Medium und 1 ml des retroviralen Überstandes versetzt. Um die Infektionseffizienz zu erhöhen, wurden dem Infektionsmedium 10 µg Polybren zugefügt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 4 ml frischen RPMI-Medium versorgt und erneut inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen passagiert und der Zellsuspension zusätzlich 4 µg/ml Puromycin zugesetzt. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte MC38-CEA-Zellen ebenfalls mit 4 µg/ml Puromycin inkubiert. Die Zellen wurden täglich unter dem Inversmikroskop kontrolliert, bis sich unter dem Selektionsdruck stabile Zellklone entwickelten. Die Zellen des Kontrollansatzes waren zu diesem Zeitpunkt erwartungsgemäß abgestorben.

Zur Subklonierung wurden die Zellen gezählt und 1 bzw. 10 Zellen in einem Volumen von 200 µl in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Nachdem unter dem Inversmikroskop Zellhaufen in den Vertiefungen sichtbar wurden, wurde einzelne Zellklone in 24-Loch-Platten oder 25 cm^2 Kulturflaschen umgesetzt. Die Zellklone wurden in einer FACS-Analyse oder Chemolumineszenz-Testung hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht und die gewünschten Zellklone weiter kultiviert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung der Luciferase 2-DNA (luc2-DNA) aus dem pGL4.30luc2-Plasmid wurde nach einem Ansatz, den Tabelle 2.17 zeigt, durchgeführt. Die Primer (Tabelle 2.18) amplifizieren ein 1672 bp großes Fragment zwischen den Basen 1361 und 3033 des pGL4.30luc2-Plasmids, in welchem das Luciferase 2-Gen liegt. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne Template-DNA durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Thermocyler 3000 (Biometra, Göttingen) und dem Programm, das Tabelle 2.19 zeigt, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 1 mM TrisHCl (pH 8,5) eluiert.

Tabelle 2.17: PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Luciferase 2-DNA aus dem pGL4.30luc2-Plasmid.

Reagenz	Zusammensetzung	
pGL4.30luc2-DNA	50	ng
10 x Puffer	5	µl
Luc2BamHIfor Primer	10	pmol
Luc2XhoIrev Primer	10	pmol
dNTPs	200	µM
Tag Polymerase	5	U
Aqua bidest.	ad 50	µl

Tabelle 2.18: Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer.

Primer	Sequenzen	Schmelztemperatur
Luc2BamHIfor	5' – CGG GAT CCT ACT GTT GGT AAA GCC ACC A – 3'	68 °C
Luc2Xholrev	5' – CCG CTC GAG TTA CAC GGC GAT CTT G – 3'	68 °C

Tabelle 2.19: PCR-Programm zur Amplifizierung der Luciferase 2-DNA aus dem pGL4.30luc2-Plasmid.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen	
1	95	2		
2	95	0,5	I	Denaturierung
3	58	1	30 Zyklen	Anlagerung der Primer
4	72	1,5	I	Extension
5	72	5		

2.2.2.2 DNA-Restriktionsverdau

Die Reaktionsansätze des DNA-Restriktionsverdaus sind der Tabelle 2.20 und Tabelle 2.21 zu entnehmen. Jeder Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C verdaut. Alle verwendeten Enzyme und Puffer wurden von der Firma Fermentas bezogen. Die Reaktionsbedingungen folgten den Herstellerangaben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines 1 %igen Agarosegels für 50 min bei einer Spannung von 110 V. Als Längenstandard diente eine 1 kb DNA-Leiter. Die verdauten DNA-Fragmente definierter Größe wurden mittels des Gel Extraction Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Tabelle 2.20: Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus des pBabe(puro)-Plasmids.

Reagenz	Zusammensetzung	
pBabe(puro)-DNA	2	µg
Tango-Puffer (10x)	6	µl
BamHI	20	U
SalI	100	U
Aqua dest.	20	µl

Tabelle 2.21: Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus der Luciferase 2-DNA.

Reagenz	Zusammensetzung	
Luc2-DNA	22	µl
Tango-Puffer (10x)	6	µl
BamHI	20	U
XhoI	20	U

2.2.2.3 DNA-Ligation

Die entstandenen Schnittstellen in Insert- und Vektor-DNA wurden in der nachfolgenden Ligation unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) zu einem neuen Plasmid zusammengefügt. Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 (w/w) angestrebt. Die verwendeten Volumina sind Tabelle 2.22 zu entnehmen. Anschließend wurden Insert- und Vektor-DNA gemischt und mit 5 x Ligasepuffer und 5 U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Transformation von kompetenten Bakterien erfolgen. Zur Religationskontrolle wurde derselbe Ansatz ohne Insert pipettiert.

Tabelle 2.22: Reaktionsansatz der Ligation von pBabe(puro)- und Luc2-DNA.

Reagenz	Zusammensetzung	
pBabe(puro)-Vektor	2,5	µl
Luc2-Insert	2	µl
5 x Ligasepuffer	4	µl
T4-DNA-Ligase	5	U
Nukleotid-freies H_2O	ad 20	µl

2.2.2.4 Bakterientransformation

Zur Bakterientransformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl kompetenter XL1-blue Bakterien für 20-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1 min einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, um durch den Hitzeschock die Bakterienmembran für die Plasmid-DNA durchlässiger zu machen. Die Suspension wurde für 2 min auf Eis abgekühlt, zur Regeneration der Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterien-Kolonien mit 5 ml LB-Flüssigmedium und 50 µg/ml Ampicillin angeimpft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bis zur Plasmid-Präparation bei 4 °C gelagert. Für eine Retransformation wurden etwa 50 ng der Plasmid-DNA mit 100 µl der kompetenten XL1-blue Bakterien auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Transformation nach Ligation.

2.2.2.5 Plasmid-DNA-Mini- und Maxipräparation

Die Minipräparation erfolgte mit dem Plasmid GeneJet Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 1 mM TrisHCl (pH 8,5) eluiert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Maxipräparation wurden etwa 0,5-1 ml der transformierten Bakteriensuspension mit 100 ml 2 x YT-Medium und 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und für 12 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Maxipräparation mit dem Plasmid DNA Purification Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde in 1 mM TrisHCl (pH 8,5) gelöst. Die Plasmidausbeute wurde photometrisch bestimmt und die Plasmidintegrität mittels erneutem Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen (Maßeinheit: optische Dichte, OD). 1 OD entsprach bei einer 1:100 (v/v) Verdünnung einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Proben wurden zusätzlich bei 280 nm und 320 nm gemessen, um Verunreinigungen mit Proteinen (280 nm) und RNA (320 nm) detektieren zu können.

2.2.2.7 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mittels der Programme SeqMan (DNA Star, Madison, USA) und Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien) mit der erwartenden Sequenz, erstellt mit EditSequence (DNA Star, Madison, USA), verglichen. Für die Sequenzierung des pBabe(puro)luc2-Plasmids wurden die Primer aus Tabelle 2.18 verwendet und nach dem Schema in Tabelle 2.23 pipettiert.

Tabelle 2.23: Reaktionsansatz für die Sequenzierung des pBabe(puro)luc2-Plasmids.

Reagenz	Zusammensetzung	
DNA	600	ng
Primer	20	pmol
Auqa bidest.	ad 7	µl

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinaufreinigung

Das ULBP2-aCEA-Konstrukt wurde von transfizierten 293T-Zellen in den Überstand sezerniert. Zur Aufreinigung wurde der gesammelte Überstand bei 2.000 g für 15 min abzentrifugiert und anschließend mittels Dialyse je nach Ausgangsvolumen auf etwa 100-300 ml eingeengt. Hierfür wurde die Flüssigkeit durch ein Dialysemembransystem mit einem molekularen Ausschlussgewicht (MWCO) von 30 kDa bei einer Flussgeschwindigkeit von 200-400 ml/min und einem Druck von 2,5 bar gepumpt. Ein 6 x His-Tag am C-terminalen Ende des ULBP2-aCEA-Konstrukts ermöglichte die anschließende Aufreinigung des Proteins durch Ni^{2+}-Affinitätschromatographie mittels Nickel-QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System (Qiagen, Hilden). Alle Schritte folgten den Herstellerangaben. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde in einem semipermeablen Dialyseschlauch (MWCO 12-14 kDa) gegen PBS für 12 h bei 4°C dialysiert. Nach 6 h wurde der Puffer einmalig gewechselt. Anschließend wurde das ULBP2-aCEA-Konstrukt über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Das aufgereinigte ULBP2-aCEA-Protein wurde nach Konzentrations- und Reinheitsbestimmung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolge in vertikalen Minigelelektrophorese-Apparaturen. Die Herstellung des Trenn- und Sammelgels erfolgte nach den Angaben in Tabelle 2.24 und Tabelle 2.25. 1 µg Protein wurde in einem Verhältnis von 1:5 (v/v) in 5 x SDS/DTT-Laufpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um später die Proteingröße bestimmen zu können, wurde eine Spur mit 5 µl einer Protein-Leiter beladen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer bei einer Spannung von 170 V für 50-60 min. Nach Beendigung des Elektropho-

rese-Laufs wurden die Gele mit 100 ml Aqua dest. auf dem Kippschüttler für 30 min bei RT gewaschen und anschließend für 1 h mit 20 ml Coomassie-Blau-Lösung gefärbt.

Tabelle 2.24: Herstellung eines 10 %igen Trenngels.

Reagenz	Zusammensetzung	
Tris (pH 8,8)	375	mM
Acrylamid	10	%
SDS	0,1	%
APS	0,1	%
TEMED	0,1	%

Tabelle 2.25: Herstellung eines 5 %igen Sammelgels.

Reagenz	Zusammensetzung	
Tris (pH 6,8)	125	mM
Acrylamid	5	%
SDS	0,1	%
APS	0,1	%
TEMED	0,1	%

2.2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Das Bradford-Reagenz wurde vor der Bestimmung im Verhältnis 1:5 (v/v) mit Aqua dest. verdünnt und mit je 200 µl in die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden eine Standardverdünnungsreihe, ein Leerwert und die Proteinlösung in Doppelbestimmung mit je 5 µl pro Vertiefung pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte nach 10-30 min am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Auswertung wurde das Programm KC4 v.3.4 (BioTek, Winooski, USA) verwendet. Die Mittelwerte der optischen Dichte (OD) wurden anhand der Referenzkurve in Konzentrationen umgerechnet.

2.2.4 Funktionelle Test

2.2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Experimente mit Zelllinien

Zur Durchführung der Bindungstests mittels Durchflusszytometrie wurden 2 x 10^5 Zellen in etwa 100-200 µl Kulturmedium in die Durchflusszytometrie-Reaktionsröhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden für 2 min bei 720 g abzentrifugiert, der Zellüberstand verworfen und das Zellpellet mittels Vibrationsschüttler aufgewirbelt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und erneut für 2 min bei 720 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgewirbelt. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die Inkubation mit den Immunliganden (1,5 µg) und rekombinantem NKG2D-Fc-Fragment (0,2 µg) erfolgte je für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit einer sättigenden Menge (2 µg) der Sekundärantikörper gemischt und für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgten 3 Waschschritte. Alle Verdünnungen erfolgten mit FACS-Puffer. Zur Messung wurden die Zellen in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und vor Licht geschützt auf Eis gelagert. Das jeweilige Pipettierschema ist Tabelle 2.26 und Tabelle 2.27 zu entnehmen. Die Messungen der Zelllinien erfolgten am FACS Calibur (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA). Pro Analyseröhrchen wurden 5.000-10.000 Ereignisse gemessen. Die Durchflussrate betrug zwischen 600-700 Zellen/s. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest pro (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA).

Tabelle 2.26: Pipettierschema des Bindungstests von ULBP2-aCEA an MC38-CEA und NKG2D.

Zellen	Immunligand	NKG2D-Fc	Sekundärantikörper
MC38-CEA		NKG2D-Fc	Anti-F(ab')2-Fragment-FITC
MC38-CEA	ULBP2-BB4	NKG2D-Fc	Anti-F(ab')2-Fragment-FITC
MC38-CEA	ULBP2-aCEA	NKG2D-Fc	Anti-F(ab')2-Fragment-FITC

Tabelle 2.27: Pipettierschema des Bindungstests von ULBP2-aCEA an MC38-CEA(luc2) und NKG2D.

Zellen	Immunligand	NKG2D-Fc	Sekundärantikörper
MC38-CEA(luc2)		NKG2D-Fc	Anti-IgG-PE
MC38-CEA(luc2)	ULBP2-aCEA	NKG2D-Fc	Anti-IgG-PE

***Ex vivo*-Experimente**

Die Messungen der murinen Blut- und Milzzellen erfolgten am FACS Gallios (Beckman Coulter, Brea, USA). Zur Optimierung der Streulicht- und Fluoreszenzparameter erfolgte eine Justierung der optischen Bank in einem Vorversuch mittels Einzelfärbungen von je 1×10^6 murinen Milzzellen. Die durch spektrale Überlappung entstehenden Fluoreszenzanteile konnten so mittels Kompensation berücksichtigt werden.

Es wurden je 1×10^6 Milzzellen bzw. 50 µl Blut in die Durchflusszytometrie-Reaktionsröhrchen vorgelegt. Die Milzzellen wurden mit 500 µl FACS-Puffer versetzt und für 2 min bei 720 g abzentrifugiert, der Zellüberstand verworfen und das Zellpellet mittels Vortex aufgewirbelt. Anschließend wurden alle Zellen mit 10 µl murinem Normalserum (Verdünnung 1:10 (v/v) in FACS-Puffer) für 10 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Ohne einen weiteren Waschschritt wurden die Zellen nun mit den jeweiligen Antikörpern versetzt und für mindestens 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Das genaue Pipettierschema ist Tabelle 2.28 zu entnehmen. Die Mengen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 2.29 zu entnehmen. Die Isotypen wurden in der Menge des entsprechenden Sekundärantikörpers eingesetzt.

Tabelle 2.28: Pipettierschema der ex vivo FACS-Analyse.

Farbe	FITC	PB	PE	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD3	CD45	TRAIL		NK1.1	CD25
2	CD3	CD45	NKG2D	CD69	NK1.1	
Isotypkontrolle (1)	CD3	CD45	Iso-IgG2a		NK1.1	Iso-IgG1
Isotypkontrolle (2)	CD3	CD45	Iso-IgG	Iso-IgG	NK1.1	

Tabelle 2.29: Mengen der verwendeten Antikörper der ex vivo FACS-Analyse.

Antikörper	Menge [µg]
CD3, NK1.1	0,5
CD45	0,15
NKG2D	1
CD25, CD69, TRAIL	0,3

Für die nachfolgende Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen mit 2 ml ACK-Puffer versetzt und für 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen 3mal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Milzzellen in 500 µl, die Blutzellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und pro Reaktionsröhrchen mit 1 µg 7-AAD versetzt. Die Analyseröhrchen wurden bis zur Messung vor Licht geschützt auf Eis gelagert. Pro Röhrchen wurden etwa 100.000-180.000 Ereignisse gemessen. Die Durchflussrate betrug zwischen 300-600 Zellen/s. Die Speicherung und Auswertung der Messergebnisse erfolgten mit Hilfe der Software Kaluza (Beckman Coulter, Brea, USA).

2.2.4.2 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay ist eine Chemolumineszenz-Messung. Luciferase-exprimierende Zellen wandeln dabei Luciferin in Anwesenheit von ATP, O_2 und Mg^{2+} zu Oxiluciferin und Lichtquanten um. Die entstehenden Photonen können vom Luminometer erfasst und quantifiziert werden.

$$\text{Luciferin} + \text{ATP} + O_2 + Mg^{2+} \xrightarrow{\text{Luciferase}} \text{Oxiluciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + \text{Licht}$$

Abbildung 2.1: Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin.

Zelllysate

Die Luciferase-Aktivität der transduzierten MC38-CEA(luc2)-Zellen wurde 2 Zellpassagen nach der Transduktion luminometrisch überprüft. Je 1 x 10^6 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt, mit 200 µl PBS gewaschen und für 3 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, das Zellpellet in

50 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei -80 °C eingefroren, um die Zelllyse zu unterstützen. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension für 3 min bei 20.800 g abzentrifugiert. Je 20 µl des Zelllysates wurden in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Loch-Platte mit klarem Boden pipettiert. Die Messung erfolgte am LB96V Microlumat plus (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bei einer Messzeit von 10 s und einer Messverzögerung von 2 s. Dabei wurden automatisch je 50 µl der Luciferase Assay Reagenz in die jeweiligen Löcher pipettiert. Die gemessenen Werte wurden in RLU (*relative light units,* relative Lichteinheite) angegeben.

Intakte Zellen

Um die Luciferaseaktivität der transduzierten MC38-CEA(luc2)-Zellen *in toto* überprüfen zu können, wurden je 2 x 10^5 Zellen in 2 ml RPMI-Medium in Doppelbestimmung in 6-Loch-Platten ausgesät und für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nichttransduzierte Zellen derselben Zelllinie. Die Messung erfolgte am Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad). Hierfür wurden je 100 µl D-Luciferin (2 mg/ml) in die Vertiefungen der 6-Loch-Platten pipettiert. Die Platte wurde für 1 s maschinell geschüttelt und die Lumineszenz mit einer Belichtungszeit von 30 s aufgenommen. Die gemessenen Werte wurden in RLU angegeben.

2.2.5 *In vivo* Experimente

2.2.5.1 Stamm, Zucht und Haltungsbedingungen

Für die Tierversuche wurden CEA (human) transgene C57BL/6J-TgN(CE4Ge)18FJP-Mäuse (C57BL/6-CEAtg) verwendet [20]. Die C57BL/6-CEAtg-Mauslinie wurde uns freundlicherweise von Paul J. Yazaki vom Beckman Research Institute of City of Hope in Kalifornien (USA) zur Verfügung gestellt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 4-12 Wochen alt. Die Haltung erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen Typ 2 auf staubfreiem Weichholzgranulat mit einer maximalen Belegungsdichte von 5 Tieren pro Käfig unter pathogenfreien Bedingungen, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einer durchschnittlichen Temperatur von 22 °C, gehalten. Die Tiere waren bis zum Beginn der *in vivo* Biolumineszenz-Messungen im Tierstall der Klinik I für Innere Medizin und anschließend im Tierstall des Max-Plank-Instituts für neurologische Forschung untergebracht. Im Umgang mit den Mäu-

sen wurde auf weitgehende Sterilität geachtet und alle wichtigen Hygienemaßnahmen eingehalten. Die Tierversuchsvorhaben wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ 9.93.2.10.31.07.135). Insgesamt wurden 29 Mäuse im Versuch eingesetzt. Die Unterscheidung der Tiere erfolgte mittels Ohrlochmarkierung. Für die Zucht der C57BL/6-CEAtg-Mäuse wurden Weibchen und Männchen für 1-2 Wochen verpaart und anschließend getrennt. Das Absetzen der Jungtiere erfolgte nach 3-4 Wochen. Die Tiere wurden frühestens nach 8 Wochen erneut verpaart.

2.2.5.2 Tumorzellinokulation

Um die Tumorzellen in die Phase exponentiellen Wachstums zu versetzen, wurden die MC38-CEA(luc2)-Zellen am Vortag der Inokulation passagiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsiniert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in sterilem PBS resuspendiert, die Zellen gezählt und anschließend mit sterilem PBS auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. Anschließend erfolgte die subkutane (s. c.) Injektion von 2×10^5 MC38-CEA(luc2)-Zellen in einem Volumen von 200 µl mittels 1 ml-Spritze und 26 G-Kanüle in die rechte Flanke von 25 C57BL/6-CEAtg-Mäusen. Vier weiteren C57BL/6-CEAtg-Mäuse wurden keine Tumorzellen injiziert. An diesen Mäusen erfolgte im weiteren Versuchsablauf keine weitere Manipulation.

2.2.5.3 Verlaufskontrolle

Die Tiere wurden 2mal wöchentlich auf Anzeichen von Tumorwachstum kontrolliert. Ab Tag 13 wurde die Entwicklung des Tumorwachstums 3mal wöchentlich manuell mittels Messschieber und 2mal wöchentlich luminometrisch objektiviert und protokolliert. An Tag 24 und 27 wurden die Tiere geopfert. Es wurden Blut, Milz, sowie die Tumore entnommen. Als vorzeitiger Versuchsendpunkt galt ein Tumorwachstum, das im größten Durchmesser eine Länge von 15 mm überschritt. Tiere, die diese Bedingungen erfüllten, wurden entsprechend den Tierschutzbestimmungen vorzeitig geopfert.

2.2.5.4 Behandlungsprotokoll

An Tag 13 nach Tumorzellinokulation wurden alle 25 Mäuse in zwei Gruppen, eine Therapie- und eine Kontrollgruppe, randomisiert. Die Therapiegruppe (13/25 Mäusen) erhielt 2mal wöchentlich über 2 Wochen eine intraperitoneale (i. p.) Injektion mit dem Immunliganden ULBP2-aCEA in einer Konzentration von 75 µg/ml in 200 µl sterilem PBS. Die Kontrollgruppe wurde zur gleichen Zeit entweder mit dem Immunliganden ULBP2-BB4, ebenfalls

75 µg/ml in 200 µl sterilem PBS, (6/25 Mäusen) oder nur mit 200 µl sterilem PBS (6/25 Mäusen) behandelt.

2.2.5.5 Bestimmung des Tumorvolumen mittels Messschieber

Das Tumorwachstum wurde 3mal wöchentlich manuell mittels Messschieber verfolgt. Hierfür wurden die Tumordurchmesser in den drei Ebenen Länge, Breite und Tiefe ausgemessen und das Volumen mit der Formel 2.2 angenähert.

$$\text{Volumen} = ½ \times (\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe})$$

Formel 2.2: Formel zur Annäherung des Tumorvolumens.

2.2.5.6 Biolumineszenz-Bildgebung (BLI)

Biolumineszenz-Bildgebung (*bioluminescence imaging*, BLI) zählt zu den optischen Bildgebungsverfahren und bietet die Möglichkeit nicht-invasiv Lichtemissionen *in vivo* zu detektieren, lokalisieren und zu quantifizierten. Das emittierte Licht wird dabei durch eine sensitive, signalverstärkende charge-coupled device (CCD) Kamera aufgenommen: Die emittierten Photonen werden über eine Serie von Linsen detektiert und über Photokathoden in Elektronen konvertiert. Nach der Amplifikation werden die Elektronen mittels Phosphorschirm wieder in Photonen konvertiert und anschließend durch den CCD-Fotosensor detektiert. Abhängig vom Typ der Photokathode lässt sich Licht verschiedener Wellenlängen detektieren. Da Photokathoden auch Licht aus dem roten Spektralbereich erkennen, werden CCD-Kameras bis zu -120 °C gekühlt. So kann das thermische Rauschen reduziert und das Verhältnis von Signal zu Hintergrund deutlich verbessert werden, ohne Einfluss auf die spektrale Sensitivität zu nehmen.

Um eine Abschwächung der Lichtemission bei der späteren Messung zu vermeiden, wurde den C57BL/6-CEAtg-Mäusen das schwarze Fell über dem gesamten Rücken regelmäßig entfernt. Das für die Versuche benötigte D-Luciferin Natriumsalz wurde in sterilem Wasser gelöst portioniert (20 mg/ml) und bis zur Verwendung durchgehend vor Lichteinfluss geschützt bei -80 °C gelagert. Die Biolumineszenz-Bildgebung der Mäuse erfolgte am Photon Imager (Biospace Lab, Paris, Frankreich). Die Mäuse wurden zur Erfassung der Tumorproliferation 2mal wöchentlich aufgenommen. Jeder Maus wurden hierfür 100 µl des

D-Luciferin-Substrates i. p. mittels einer 1 ml-Spritze und einer 30 G-Kanüle injiziert. Nach 10 min konnten die *in vivo* Biolumineszenz-Messungen durchgeführt werden. Zwischenzeitlich wurden die Mäuse in eine Narkosekammer verbracht und mittels Inhalationsanästhesie mit 3,5 Vol. % Isofluran in 100 Vol. % Sauerstoff narkotisiert. Während der Messung wurde die Narkose mit 2 Vol. % Isofluran in 100 Vol. % Sauerstoff über Atemmasken aufrechterhalten. Für die Messung wurden die Mäuse in Bauchlage unter die Kamera des *in vivo* Imaging-Systems (IVIS) verbracht. Vor jeder Messung wurden Schärfentiefe und Auflösung neu justiert. Die Aufnahmen wurden mit Belichtungszeiten von 60 s und anschließend 30 s durchgeführt.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der M3 Vision Software (Biospace Lab, Paris, Frankreich) analysiert. Hierfür wurden über jedem Tumor bestimmte Bereiche markiert (*region of interest*, ROI). Die ROI-Fläche wurde dabei für die einzelnen Messungen immer gleich groß gewählt und so platziert, dass die Stelle der höchsten Lichtintensität im Fokus lag. Ausgewertet wurde die mittlere Lichtintensität über den Tumoren mit der Einheit Zählimpuls pro Minute (*counts per minute*, cpm). Als Vergleichsmaß wurde eine weitere großflächigere ROI wurde in den Bildhintergrund gelegt. Um das Hintergrundrauschen zu minimieren, wurde die mittlere Lichtintensität des Hintergrunds von der mittleren Lichtintensität über dem Tumor abgezogen. Anhand der Änderung der Lichtintensität über die Zeit ließ sich die Tumorentwicklung graphisch darstellen.

Die Biolumineszenz-Messungen erfolgten in Kooperation mit Roland Ullrich, Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 832.

2.2.5.7 Sektion der Tiere

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde den Tieren aus den Schwanzvenen Blut entnommen. Um den vasodilatatorischen Effekt für die folgende Blutabnahme zu nutzen, wurden die Mäuseschwänze zuvor mit einer Infrarotlichtlampe bestrahlt. Anschließend wurde die nicht innervierte Schwanzspitze abgetrennt und das Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 40 µl Heparin aufgefangen. Das Blut wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Insgesamt wurden pro Maus etwa 200 µl Blut gewonnen.

Anschließend wurden die Mäuse geopfert und seziert. Dazu wurde über einen Schnitt in der linken Flanke die Milz entfernt. Der subkutan liegende Tumor wurde entnommen, indem vorsichtig die Haut abgelöst und der darunter liegende Tumor möglichst voll-

ständig in seiner Kapsel entfernt wurde. Die Tumore wurden direkt in 1,8 ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert. Die Milzen wurden mit Hilfe einer 20 G-Kanüle vorsichtig aufgeschlitzt und ausgestrichen. Die gewonnene Zellsuspension wurde über ein steriles Zellsieb (Porengröße 100 µm) pipettiert und die Zellen gezählt. Für die nachfolgende FACS-Analyse wurden 1 x 10^6 Milzzellen in RPMI-Kulturmedium bzw. 50 µl Blut pro Durchflusszytometrie-Reaktionsröhrchen vorgelegt.

2.2.5.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse des Tumorwachstums und der Durchflusszytometrie-Ergebnisse wurden mit dem t-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Für die statistische und graphische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 ULBP2-antiCEA kann in 293T-Zellen exprimiert und aus Zellkulturüberstanden aufgereinigt werden

Zur Gewinnung des Immunliganden für die *in vitro* und *in vivo* Versuche, wurde das ULBP2-antiCEA-Konstrukt (ULBP2-aCEA) in 293T-Zellen transfiziert. Das Protein konnte mittels Ni^{2+}-Affinitätschromatographie über das 6 x His-Tag aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Größe und Homogenität konnte über SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1). Die Konzentration wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Aufreinigungstabelle für den Immunoliganden ULBP2-aCEA.

Das ULBP2-aCEA-Protein konnte aus dem Überstand von transfizierten 293T-Zellen über Ni^{2+}-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. In der Tabelle sind die Volumina der gesammelten Überstände und die gewonnenen Mengen an ULBP2-aCEA dargestellt.

Lauf	Ausgansvolumen [ml]	Endvolumen [ml]	Endgewicht [µg]
1	2000	0,65	50,7
2	2500	0,86	206,4
3	2500	0,88	195,4
4	3300	0,87	203,6
7	2600	0,70	192,5
8	2750	1,00	115,0

Die Auftrennung des gereinigten Proteins über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ist exemplarisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Immunligand ULBP2-aCEA besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 55 kDa. Aufgrund von Glykosylierungen im Rahmen von postranslationaler Modifizierung zeigte sich die Proteinbande im Gel bei etwa 70 kDa. Es zeigten sich geringe Nebenbanden, die auf Degradationsprodukte und gleichzeitig aufgereinigte Proteine hinweisen. Die gewonnenen Proteinmengen lagen im Bereich von 50-200 µg pro Reinigungsansatz aus dem Zellüberstand.

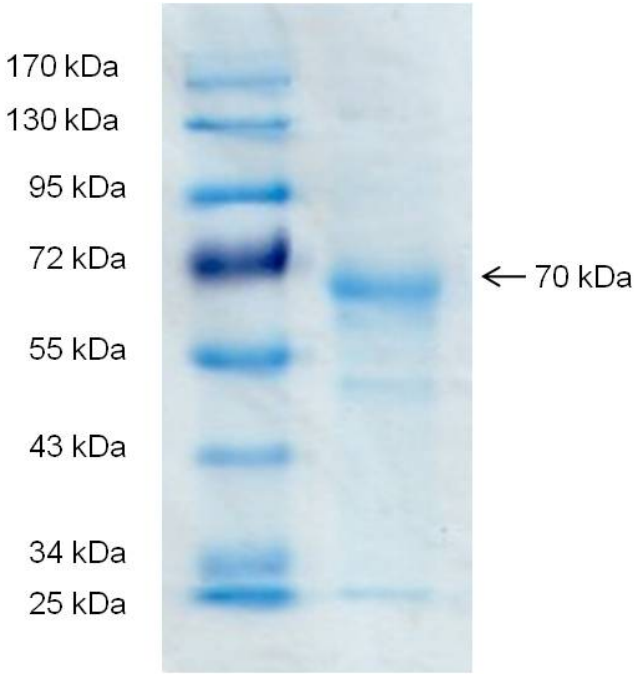

Abbildung 3.1: Auftrennung des ULBP2-aCEA-Konstrukts in einer SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau.

1 µg des aufgereinigten Proteins wurde in einer SDS-PAGE und in einer Coomassie-Färbung dargestellt. Es zeigte sich eine Proteinbande bei 70 kDa.

3.2 ULBP2-antiCEA bindet spezifisch an MC38-CEA-Zellen und rekombinanten NKG2D-Rezeptor

Der Immunligand ULBP2-aCEA ist ein Fusionsprotein aus einem abgeleiteten Einzelkettenantikörper, der CEA auf Kolonkarzinomzellen detektiert, und ULBP2, einem spezifischen Liganden für NKG2D (*natural killer group 2 member D)*. ULBP2-aCEA ermöglicht so die Quervernetzung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) mit CEA^+ Tumorzellen. Diese spezifische Bindung sollte mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation von CEA^+ murinen Kolonkarzinomzellen (MC38-CEA) mit ULBP2-aCEA, rekombinantem NKG2D-Fc und anti-human-F(ab')2-Fragment-FITC zeigte sich eine deutliche Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) (Abbildung 3.2A, rot) im Vergleich zum Ansatz ohne ULBP2-aCEA (Abbildung 3.2A, grau). Eine Inkubation von MC38-CEA mit ULBP2-BB4 und NKG2D-Fc zeigte erwartungsgemäß keine Bindung (Abbildung 3.2A, orange). ULBP2-BB4 bindet mit

seiner BB4-Bindungsdomäne spezifisch an das Oberflächenantigen CD138, welches nicht von MC38-Zellen exprimiert wird.

Demzufolge resultiert die Inkubation von ULBP2-aCEA mit MC38-CEA und rekombinantem NKG2D-Fc in einer simultanen Bindung. ULBP2-BB4 hingegen kann als unspezifischer Immunligand keine Quervernetzung bewirken. Das Bindungsverhalten der MC38-CEA-Zellen veränderte sich durch die retrovirale Transduktion mit Luciferase nicht (Abbildung 3.2B).

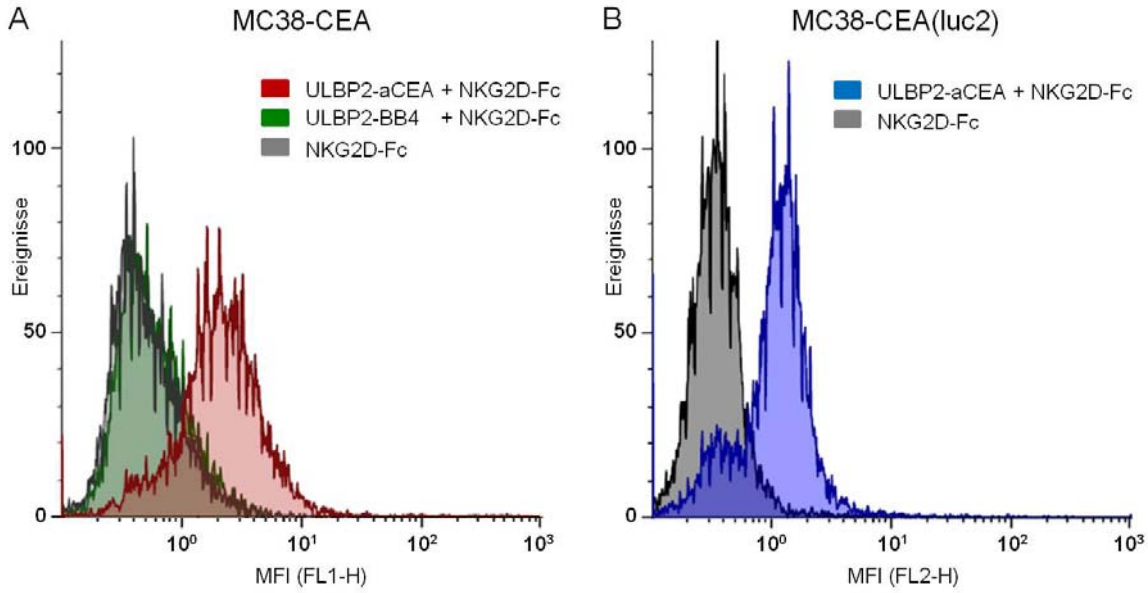

Abbildung 3.2: ULBP2-aCEA bindet simultan an MC38-CEA bzw. MC38-CEA(luc2) und NKG2D.

(A) Inkubation von MC38-CEA mit ULBP2-aCEA (rot) bzw. ULBP2-BB4 (orange) und rekombinantem NKG2D-Fc. Der Nachweis der Bindung erfolgte mittels Anti-F(ab')2-Fragment-FITC. Als Ersatz einer Isotypkontrolle dient ein Ansatz mit MC38-CEA, NKG2D-Fc und dem Sekundärantikörper in Abwesenheit von ULBP2-aCEA (grau).
(B) Inkubation von MC38-CEA(luc2) (blau) mit ULBP2-aCEA und rekombinantem NKG2D-Fc. Der Nachweis der Bindung erfolgte mittels Anti-IgG-PE. Ersatz der Isotypkontrolle: MC38-CEA(luc2), NKG2D-Fc und Sekundärantikörper in Abwesenheit von ULBP2-aCEA (grau).

3.3 Etablierung eines *in vivo* Biolumineszenz-Mausmodels

Das Wachstum der CEA-transfizierten, murinen Kolonkarzinomzelllinie (MC38-CEA) in CEA-transgenen Mäusen sollte mittels *in vivo* Bioluminezenz-Bildgebung verfolgt werden. Für die Etablierung dieses *in vivo* Biolumineszenz-Mausmodels wurde die MC38-CEA-Zelllinie mit dem Luciferase-Gen transduziert und die Luciferase-Aktivität *in vitro* und *in vivo* überprüft. Die Messwerte aus der Biolumineszenz-Bildgebung wurden mit den manuellen Messungen des Tumorvolumens verglichen.

3.3.1 Luciferase kann in MC38-CEA-Zellen exprimiert und die Luciferase-Aktivität gemessen werden

Für die Etablierung des *in vivo* Biolumineszenz-Mausmodels wurde das Luciferase 2-Gen in den retroviralen Vektor pBABE(puro) kloniert (pBABE(puro)luc2). Der pBABE(puro)luc2-Vektor konnte anschließend mittels retroviraler Transduktion stabil in die MC38-CEA-Zelllinie eingebracht werden (MC38-CEA(luc2)). Die Transfektionseffizienz wurde mittels *in vitro* Lumineszenz-Assays in Zelllysaten und intakten Zellen untersucht. Gemessen wurden die mittleren Lichtintensitäten (*relative light units*, RLU) über den Vertiefungen. Abbildung 3.3 stellt exemplarisch die ermittelten Photoemissionen in Luciferase-Assays von MC38-CEA(luc2) und MC38-CEA für die Messung von Zelllysaten (Abbildung 3.3A) und intakten Zellen (Abbildung 3.3B) dar. In der Zelllysat-Messung zeigten die Luciferase transfizierten Zellen eine 1.000fach größere Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.3A). Die intakten MC38-CEA(luc2)-Zellen zeigten eine etwa 200fach höhere Photoemission (Abbildung 3.3B).

Die transfizierten MC38-CEA(luc2)-Zellen zeigen eine deutliche Luciferase-Aktivität im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, damit erfüllen sie prinzipiell die Anforderung zur Verwendung in der *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung.

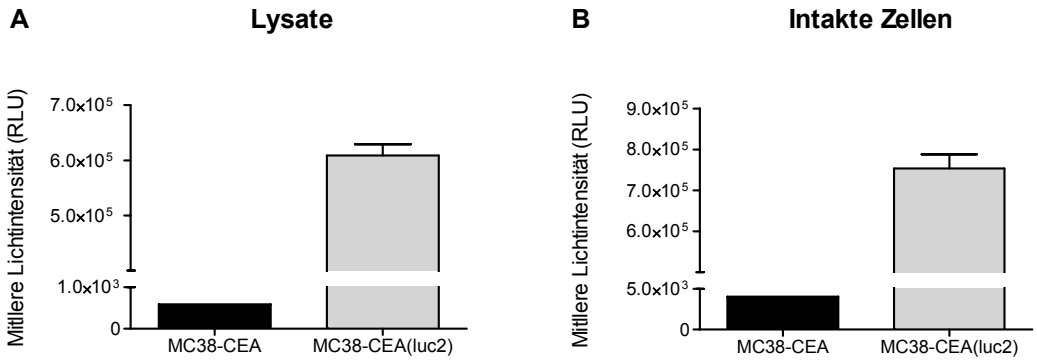

Abbildung 3.3: Luciferase-Assays der MC38-CEA(luc2)-Zelllysate (A) und in vitro Luciferase-Assay (B).

Dargestellt sind die mittleren Lichtintensitäten für MC38-CEA und MC38-CEA(luc2).
(A) Die Messung erfolgte für 10 s. Die Luciferase-transfizierten Zellen zeigten Werte von 609.032 RLU (n=2) im Vergleich zu 590 RLU (n=1) der nicht transfizierten Kontrolle.
(B) Die Photoemission wurde mit einer Belichtungszeit von 30 s aufgenommen. Die MC38-CEA(luc2)-Zellen zeigten eine mittlere Lichtintensität von 753.425 RLU (n=2) im Vergleich zu 4.040 RLU (n=1) bei den MC38-CEA-Zellen.

3.3.2 MC38-CEA(luc2)-Wachstum kann in CEA transgenen Mäusen mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung detektiert werden

Nachdem die Luciferase-Aktivität der MC38-CEA(luc2)-Zellen *in vitro* gezeigt wurde, sollte die Aktivität *in vivo* überprüft werden. Hierfür wurden 2 x 10^5 MC38-CEA(luc2)-Zellen subkutan in die Flanke von CEA transgenen C57BL/6 Mäusen (C57BL/6CEAtg) injiziert. Das Tumorwachstum wurde mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung (*bioluminescence imaging*, BLI) an den Tagen 13, 16, 20, und 23 nach Injektion verfolgt. Außerdem wurde das Tumorvolumen manuell über die Ermittlung der Tumordurchmesser bestimmt.

Das kontinuierliche Wachstum der subkutanen Knoten konnte in den *in vivo* Biolumineszenz-Aufnahmen nachvollzogen werden. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch für 6 Mäuse das typische Biolumineszenz-Signal eines subkutan lokalisierten Tumors. Die Tumorentwicklung konnte von anfangs kleinen Tumorknoten bis zur Ausbildung ausgedehnter Tumorbefunde verfolgt werden. Die oberflächige Lage der Tumore und die dadurch bedingte minimale Abschwächung des produzierten Lichts ermöglichte die Darstellung und Detektion sehr kleiner Tumorzellverbände. So konnten auch Tumorknoten < 0,2 mm Breite im BLI

dargestellt werden, die unter Haut noch nicht sichtbar oder palpabel waren. Metastasierungen, beziehungsweise eine Ausbreitung der subkutanen Tumore entlang von Lymph- oder Blutgefäßen der Bauchwand wurde nicht beobachtet.

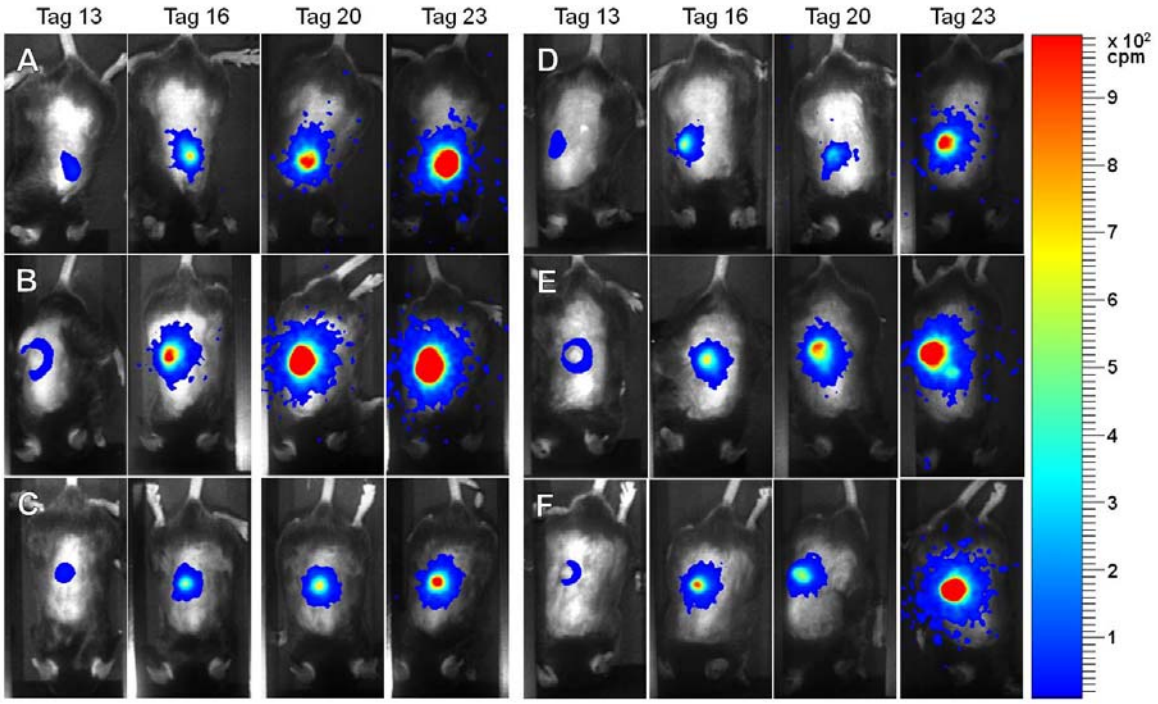

Abbildung 3.4: Biolumineszenz-Aufnahmen von 6 Mäusen in Bauchlage an den Tagen 13, 16, 20 und 23 nach subkutaner Injektion von 2 x 10^5 MC38-CEA(luc2)-Zellen in die rechte Flanke.

Dargestellt sind die mittleren Lichtintensitäten über den Tumorarealen. Blau entspricht dabei einem niedrigen Signal, rot entspricht einem hohen Signal (siehe Skalierung). Die Tumore entwickelten sich von kleinen Tumorzellverbänden zu großen subkutanen Knoten.

Die Tumorentwicklung konnte durch die Messung der mittleren Lichtintensität über dem Tumorareal quantitativ erfasst werden. Diese Daten bildeten die Grundlage für den Vergleich der Biolumineszenz-Signale mit den Tumorvolumina, die näherungsweise über die manuelle Messung der Tumordurchmesser ermittelt wurde. Abbildung 3.6 stellt dies für dieselben 6 Mäuse wie in Abbildung 3.4 vergleichend dar. Die gemessenen Signalintensitäten entsprachen in den dargestellten Fällen den manuell ermittelten Tumorvolumina. Schwan-

kungen in den Kurven sind auf die Empfindlichkeiten der Untersuchungstechniken zurückzuführen. Abbildung 3.5 stellt die Korrelation der beiden Verfahren unter Berücksichtigung aller Messwerte (n=70) dar. In diese Auswertung wurden nur Messwerte von Tag 13, 20 und 23 eingeschlossen, da hier die BLI-Aufnahmen und die Tumorvolumenmessung am gleichen Tag durchgeführt wurden. 3 Messwerte (mit Sternchen markierte rote Punkte) wurden aus der Berechnung des Korrelationskoeffizienten und Bestimmung der Regressionsgeraden ausgeschlossen, da sie trotz eines großen Tumorvolumens nahezu keine Biolumineszenz zeigten. Diese Abweichungen sind am ehesten auf eine fehlerhafte Luciferin-Injektion zurückzuführen. Es besteht ein positiv linearer Zusammenhang zwischen BLI-Signal und Tumorvolumen. Der Korrelationskoeffizient R^2 beträgt 0,725 nach Ausschluss der 3 Messwerte und 0,35 bei Einschluss der Werte.

Die Biolumineszenz-Bildgebung ermöglicht demnach die Tumorprogression in Mäusen *in vivo*, nicht-invasiv über einen Zeitraum zu verfolgen.

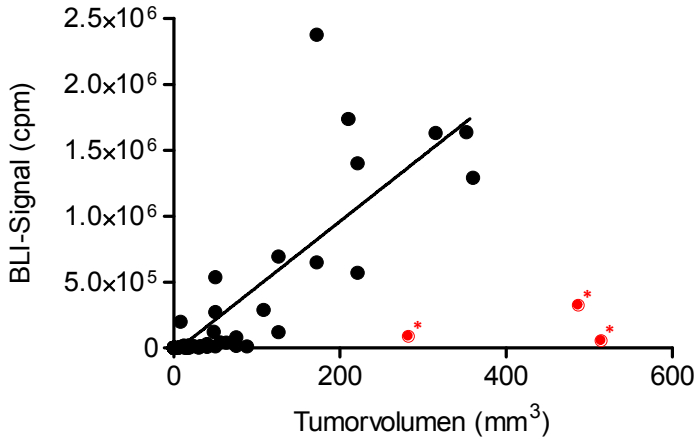

Abbildung 3.5: Korrelation zwischen dem BLI-Signal und Tumorvolumen.

Es besteht ein positiv linearer Zusammenhang zwischen dem BLI-Signal und Tumorvolumen. Die mit Sternchen markierten roten Messpunkte wurden aus der Berechnung des Korrelationskoeffizienten und Bestimmung der Regressionsgeraden ausgeschlossen. Die stark abweichenden Werte sind am ehesten auf eine fehlerhafte Luciferin-Injektion zurückzuführen. Der Korrelationskoeffizient R^2 beträgt nach Ausschluss der 3 Messwerte 0, 725 (n=70).

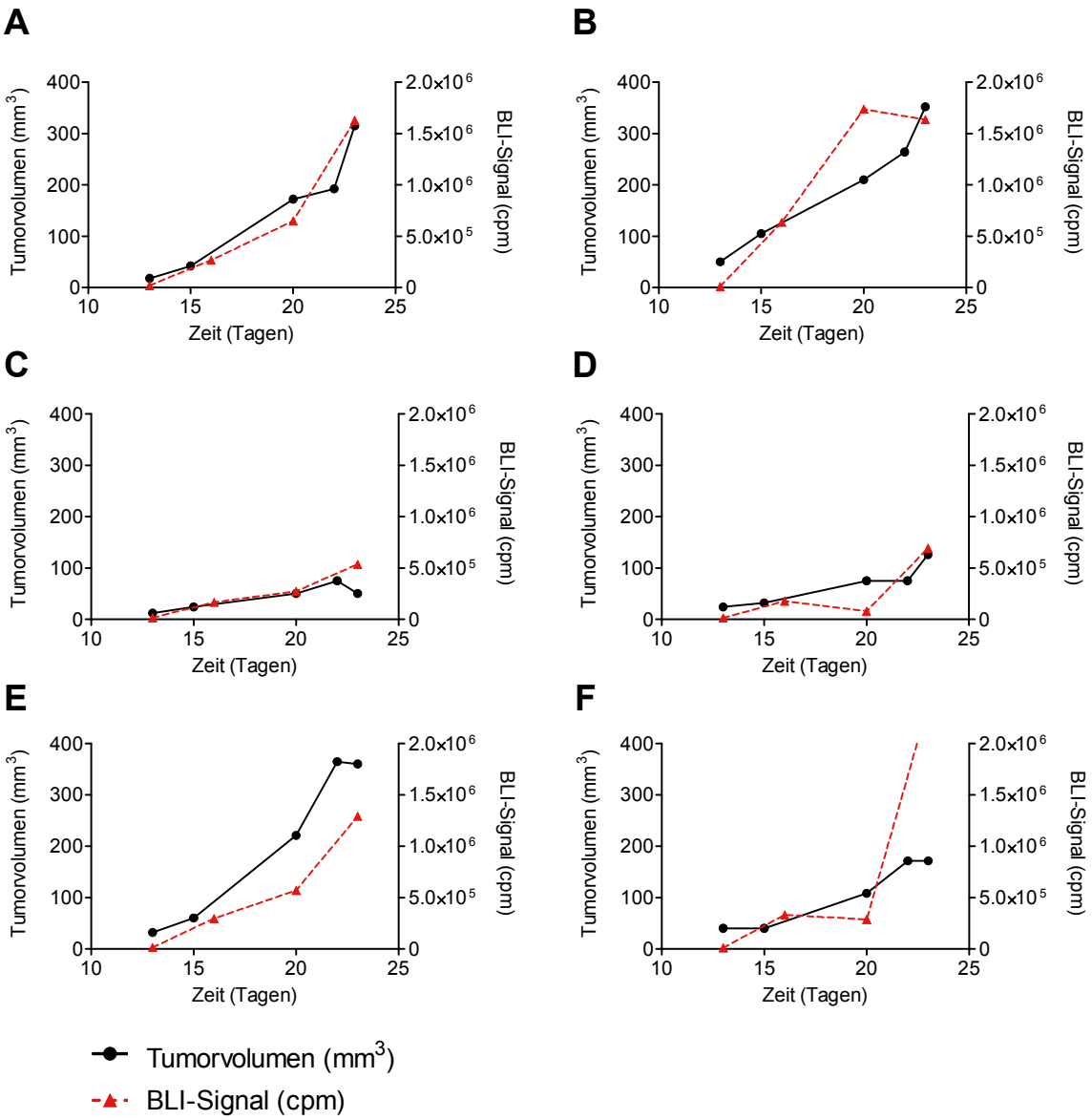

Abbildung 3.6: Vergleich der Entwicklung des Tumorvolumens (schwarz, linke Ordinate) und des BLI-Signals (rot gestrichelt, rechte Ordinate) exemplarisch für 6 Mäuse.

Das Biolumineszenz-Signal entsprach in den dargestellten Fällen der Tumorentwicklung. Abweichungen zwischen den Kurven sind auf die Messungenauigkeiten der Verfahren zurückzuführen. Der letzte BLI-Wert in Abbildung F (2,4x10^6 cpm) liegt außerhalb des dargestellten Bereichs. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet ihn darzustellen.

3.4 Das syngene Mausmodell

Die Effektivität von ULBP2-aCEA konnte *in vitro* und in einem *in vivo* Nacktmausmodell bereits nachgewiesen werden [Rothe et al., Publikation in Vorbereitung]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob ULBP2-aCEA in der Lage ist, Lymphozyten in einem syngenen Modell zu aktivieren.

Hierfür wurden 25 C57BL/6-CEAtg-Mäusen 2 x 10^5 MC38-CEA(luc2)-Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. An Tag 13 nach der Tumorzellinjektion wurden die Mäuse in eine Therapie- und eine Kontrollgruppe randomisiert. 13 Mäuse (Therapiegruppe) wurden an den Tagen 13, 16, 20 und 23 *post injectionem* (p. i.) mit 15 µg ULBP2-aCEA therapiert. Die restlichen 12 Mäuse (Kontrollgruppe) erhielten eine Placebotherapie mit 15 µg ULBP2-BB4 (6/12 Mäuse) oder steriles PBS (6/12 Mäuse). Die Verabreichung erfolgte jeweils intraperitoneal in 200 µl sterilem PBS. Die Tumorentwicklung wurde *in vivo* nichtinvasiv mit Hilfe des BLI und über Bestimmung der Tumordurchmesser mit Annäherung an das Tumorvolumen verfolgt. Die BLI-Aufnahmen wurden an den Tagen 13, 16, 20 und 23 p. i. durchgeführt. Die Messung der Tumordurchmesser erfolgte an den Tagen 13, 15, 17, 20, 22 und 23 nach Tumorzellinokulation. Außer an Tag 17 erfolgten alle Messungen der Tumordurchmesser in Narkose. Die Messwerte weichen an diesem Tag stark von den restlichen Messungen ab. Sie wurden deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Mäuse wurden nach 24 Tagen (Therapiegruppe) und 27 Tagen (Kontrollgruppe) p. i. geopfert und die Lymphozyten des peripheren Blutes und der Milz hinsichtlich ihres Aktivitätsstatus in der Durchflusszytometrie untersucht. Eine Maus der ULBP2-BB4-Kontrollgruppe starb an Tag 23 während der BLI-Messungen aufgrund einer Überdosierung der Narkosemittel.

Das vollständige Behandlungs- und Verlaufsprotokoll ist Abbildung 3.7 zu entnehmen.

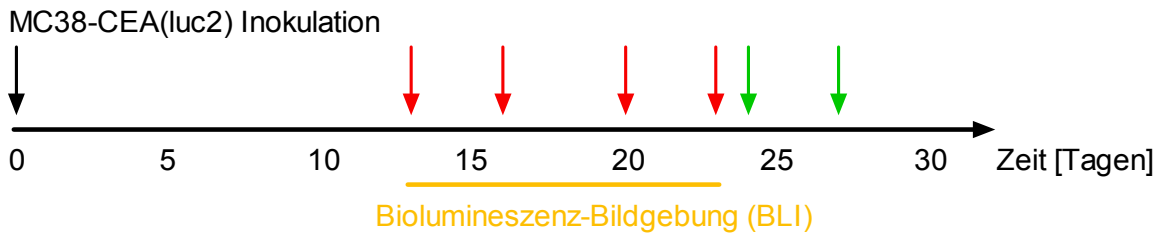

Abbildung 3.7: Ablauf des Mausversuchs.

Ab Tag 13 nach Tumorzellinokulation wurden 13/25 Mäuse an den Tagen 13, 16, 20 und 23 mit 15 µg ULBP2-aCEA therapiert (rote Pfeile). 6/25 Mäuse erhielten zum selben Zeitpunkt 15 µg ULBP2-BB4, 6/25 Mäuse erhielten PBS. Die Verabreichung erfolgte jeweils intraperitoneal in 200 µl sterilem PBS. Über den gesamten Behandlungszeitraum wurde die Tumorprogression manuell und in der Biolumineszenz-Bildgebung (BLI) verfolgt (gelber Balken). An Tag 24 wurden die Mäuse der Therapiegruppe und an Tag 27 die Mäuse der Kontrollgruppe geopfert und die Blut- und Milzlymphozyten durchflusszytometrisch untersucht (grüne Pfeile).

3.4.1 ULBP2-antiCEA aktiviert Lymphozyten *in vivo*

Nach Opferung der Tiere wurde die Lymphozytenaktivität der Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurden NK-Zellen, T-Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) aus dem peripheren Blut und aus der Milz. Der Aktivierungsstatus wurde anhand der Expression der Oberflächenantigene NKG2D, CD69, TRAIL und CD25 interpretiert. Außerdem wurden die relativen Zellzahlen bestimmt. Neben der Therapie- und Kontrollgruppe wurde eine weitere Gruppe von 4 Mäusen untersucht, denen keine Tumorzellen injiziert wurden und denen auch keine weitere Behandlung zuteilwurde. Mit den Daten dieser Vergleichsgruppe konnten Basiswerte für die relativen Zellzahlen und die Expression der Oberflächenmarker bestimmt werden.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen in der relativen Zellzahl bei den drei untersuchten Zellpopulationen zwischen Therapie- und Kontroll- oder Vergleichsgruppe festgestellt werden (Abbildung 3.9).

In der Analyse des Aktivierungsstatus der Lymphozyten hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede in den verschiedenen Gruppen. Abbildung 3.8 stellt die Ergebnisse

graphisch dar. In der Therapiegruppe zeigte sich eine signifikant erhöhte CD69-Expression auf allen 3 Zelltypen sowohl im peripheren Blut als auch in der Milz. Die Milzlymphozyten zeigten eine 2fach erhöhte CD69-Expression auf NK-Zellen und T-Zellen. Die Expression auf NKT-Zellen war ebenfalls erhöht. Im peripheren Blut zeigte sich eine 2-3fach erhöhte Expression auf allen 3 Zellpopulationen. Die CD69-Expression der Kontrollgruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe (Basiswert).

Die NKG2D-Expression auf NK-Zellen und NKT-Zellen der Therapiegruppe lag auf Höhe der Basisexpression (Vergleichsgruppe). NK-Zellen und NKT-Zellen der Kontrollgruppe zeigten im Vergleich eine leicht verminderte NKG2D-Expression. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Es zeigte sich kein Unterschied der NKG2D-Expression auf T-Zellen.

Die Expression von TRAIL lag auf allen Zellpopulationen unterhalb der Detektionslevel. Die CD25-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bzw. im Vergleich zum Basiswert. Es konnte lediglich eine vermehrte Expression von CD25 auf NK-Zellen der Milz in der Kontrollgruppe festgestellt werden, während in der Therapie- und Vergleichsgruppe kein CD25 auf NK-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikant erhöhte CD69-Expression nach der ULBP2-aCEA-Therapie. Weitergehend zeigte sich keine verminderte Expression von NKG2D durch die Therapie mit ULBP2-aCEA.

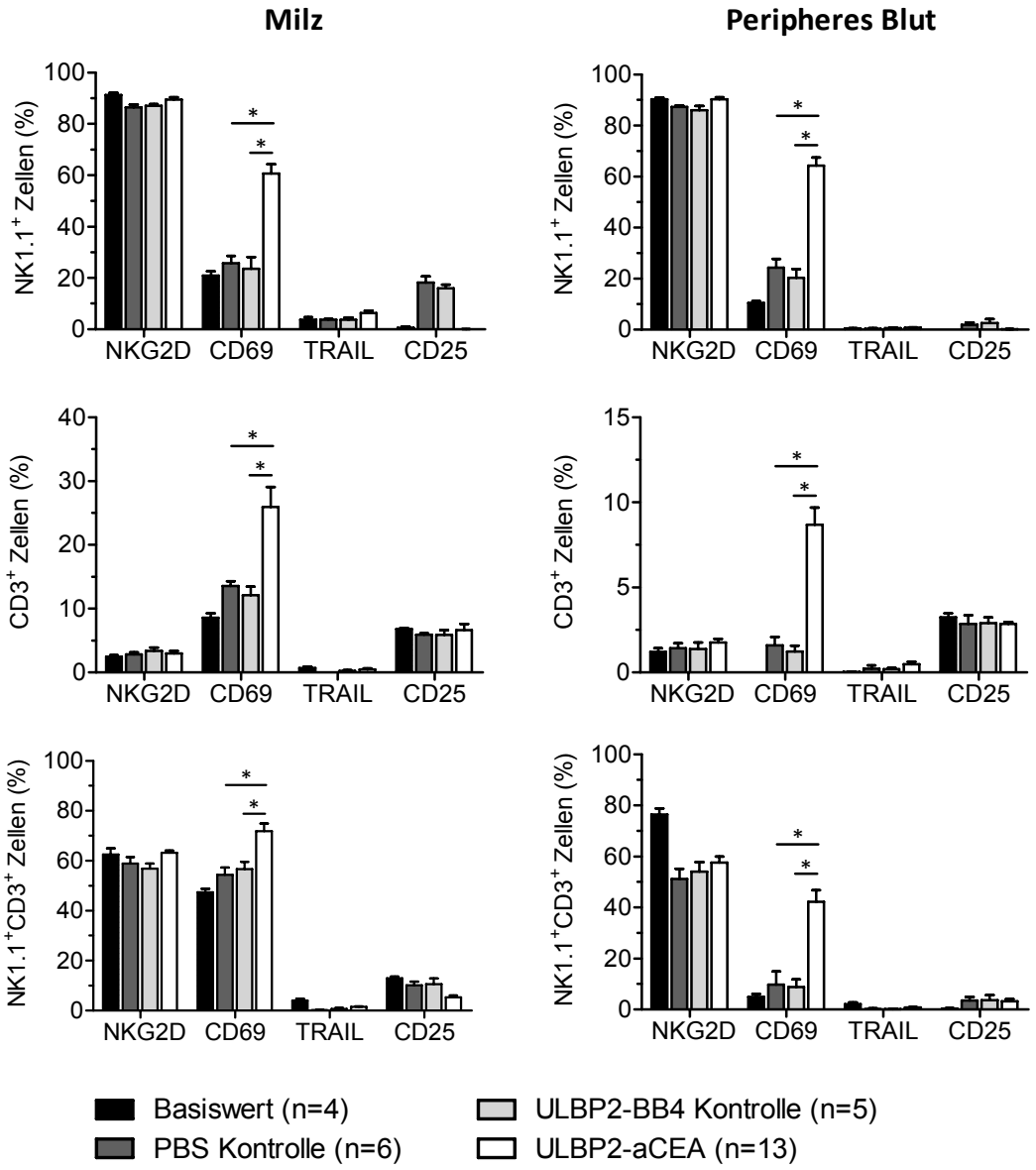

Abbildung 3.8: Oberflächenexpression von NKG2D, CD69, TRAIL und CD25 auf NK-Zellen, T-Zellen und NKT-Zellen im peripheren Blut und der Milz bei Therapie- (weiß) und Kontrollgruppe (dunkel, hellgrau), sowie dem Basiswert (schwarz).

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte CD69-Expression auf allen 3 Zelltypen der Therapiegruppe im peripheren Blut und der Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Desweiteren zeigte sich keine verminderte Expression von NKG2D durch die Therapie mit ULBP2-aCEA. Es konnte keine Expression von TRAIL auf den Zellen detektiert werden. CD25 wurde auf NK1.1$^+$ Milzzellen in der Kontrollgruppe hochreguliert.

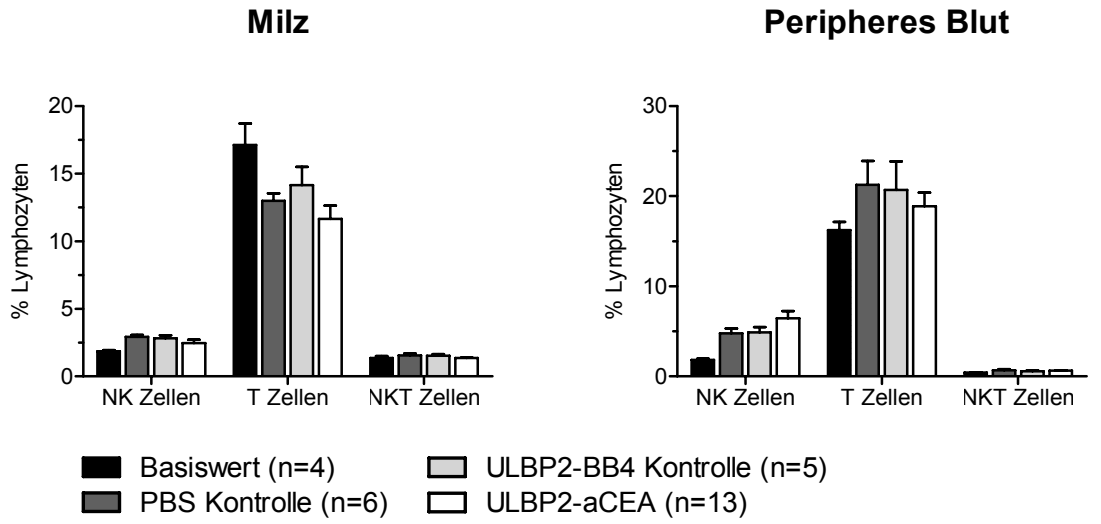

Abbildung 3.9: Relative Zellzahlen der NK-Zellen, T-Zellen und NKT-Zellen im peripheren Blut und der Milz bei Therapie- (weiß) und Kontrollgruppe (dunkelgrau, hellgrau).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen der relativen Zellzahlen bei den untersuchten Zelltypen zwischen Therapie- und Kontrollgruppen oder in Bezug auf die Vergleichsgruppe festgestellt werden. Der Basiswert (schwarz) wurde aus einer Vergleichsgruppe (n=4) ohne jegliche Behandlung oder Tumorzellinokulation ermittelt.

3.4.2 Geringer Einfluss von ULBP2-antiCEA auf das Tumorwachstum von CEA$^+$ Tumoren in CEA-transgenen Mäusen

Der Einfluss der ULBP2-aCEA-Therapie auf die Tumorprogression wurde sowohl mit Hilfe der BLI-Daten als auch mittels der Ergebnisse der manuellen Volumenmessungen analysiert. Insgesamt zeigte sich in der Therapie- und in der Kontrollgruppe ein sehr inhomogenes Tumorwachstum. Die Wachstumsgeschwindigkeit differierte von einem stark progredienten Tumorwachstum bis zu keinem Wachstum. Diese unterschiedlichen Wachstumsdynamiken innerhalb der Gruppen erschwerten die Analyse in Bezug auf einen Therapieerfolg.

In Abbildung 3.10 sind die Mittelwerte der BLI-Signale (A) und ermittelten Tumorvolumina (B) mit Standardfehler in der Therapie- und der Kontrollgruppe (ULBP2-BB4 oder PBS) dargestellt. Zusammenfassend zeigte sich bei hohen Standardabweichungen kein signifikanter Einfluss auf das Tumorwachstum durch die ULBP2-aCEA-Therapie, jedoch war

bei den behandelten Mäusen die Tendenz zu einem geringeren Tumorwachstum erkennbar. Der Versuch wurde nach einem kurzen Therapie- und Beobachtungszeitraum von zwei Wochen beendet, sodass keine Aussage über eine weitere Entwicklung des Tumorwachstums in den beiden Gruppen getroffen werden kann.

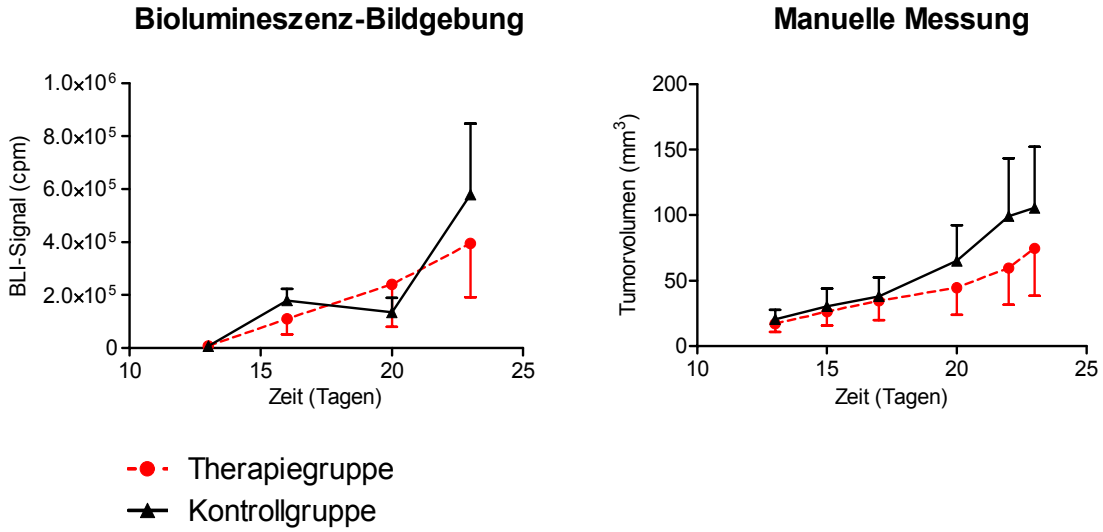

Abbildung 3.10: Verläufe des Tumorwachstums in der Therapie- (gestrichelte, rote Linie) und der Kontrollgruppe (durchgezogene, schwarze Linie) dargestellt in BLI-Werten und manuell ermittelten Tumorvolumina.

Es zeigte sich bei hoher Standardabweichung kein signifikanter Einfluss auf das Tumorwachstum durch die ULBP2-aCEA-Therapie.

4 Diskussion

4.1 Die Behandlung mit ULBP2-antiCEA bewirkt eine Lymphozytenaktivierung *in vivo*

Viele Studien konnten zeigen, dass das natürliche und adaptive Immunsystem eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Tumorwachstums einnehmen. Dies konnte auch für das Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Die Etablierung immunologischer Therapieansätze auf diesem Gebiet liegt daher nahe.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Stimulation autologer natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) mit Hilfe des Immunliganden ULBP2-antiCEA (ULBP2-aCEA) *in vivo* zu einer NK-Zellaktivierung gegenüber Kolonkarzinomzellen führt. Hierfür wurde ein syngenes Mausmodell mit CEA-transgenen Mäusen und mit CEA^+ Tumorzellen etabliert. Der Immunligand sollte dabei über die Vernetzung der NK-Zellen mit CEA^+ Tumorzellen eine Aktivierung der NK-Zellen und nachfolgend eine Tumorantigen-spezifische Immunantwort auslösen. Neben der NK-Zellaktivierung wurde eine mögliche Aktivierung von T-Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) überprüft. Die Induktion einer tumorspezifischen T-Zellantwort durch NK-Zellen konnte *in vivo* bereits in anderen Modellen beobachtet werden [30] [70]. Es gibt viele Hinweise, dass diese T-Zellaktivierung über dendritische Zellen vermittelt wird [48] [73] [82] [93] [133].

Der Aktivierungsstatus der murinen Milz- und Blutlymphozyten nach der ULBP2-aCEA-Therapie wurde mittels Durchflusszytometrie anhand der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche untersucht. Dabei zeigen die verschiedenen Marker eine unterschiedliche Kinetik. Aktivierte und proliferierende Lymphozyten exprimieren unter anderem die Oberflächenmoleküle CD69 und CD25.

Nach der Zellaktivierung ist CD69 das früheste, induzierbare Glykoprotein auf der Zelloberfläche [13] [25] [57] [76]. CD69 wird unter anderem von T- und B-Lymphozyten, sowie NK-Zellen und NKT-Zellen exprimiert [128] [146]. Die CD69-Expression ist dabei in die Lymphozytenproliferation und die Zytokinsynthese involviert [84]. Dem CD69-Anstieg folgt die Expression von CD25. Die IL-2-Rezeptor α-Kette (CD25) wird ebenfalls auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, NK- und NKT-Zellen exprimiert [21] [79] [91]. Als Homodimer bildet

CD25 einen niedrigaffinen Rezeptor ohne Signaltransduktionseigenschaften. Erst durch Zusammenschluss mit der β- und γ-Kette wird der hochaffine IL-2-Rezeptor gebildet. Die Wechselwirkung von CD25 und IL-2 ist für die Lymphozytenproliferation und -differenzierung, insbesondere der T-Zellen entscheidend [91] [119]. Innerhalb von 3 h nach einer Stimulation kann CD69 auf der Zelloberfläche detektiert werden. Der Höhepunkt der Expression liegt etwa bei 12-24 h [27] [84] [128]. Im Vergleich dazu zeigt CD25 seinen Expressionshöhepunkt erst nach 72-96 h Stimulation [12]. Die CD25-Expression scheint dabei enger mit der Zellproliferation zu korrelieren, als die Expression von CD69 [21]. Beide Marker sind demnach geeignet, um eine kurz- und langfristige Lymphozytenaktivierung zu verfolgen und wurden daher als Aktivierungsmarker der *in vivo* Versuche gewählt.

In den FACS-Analysen zeigte sich auf allen drei untersuchen Zelltypen eine verstärkte Expression von CD69 in der Therapiegruppe. Eine Hochregulation von CD25 konnte nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich die Lymphozyten zum Zeitpunkt der Messung in einer frühen Phase der Aktivierung befanden. Die Aktivierung der NK-Zellen wurde dabei vermutlich direkt über die Bindung des Immunliganden ULBP2-aCEA vermittelt. Diese Interaktion konnte *in vitro* bereits gezeigt werden [Rothe et al., Publikation in Vorbereitung]. Während bei NK-Zellen eine direkte Aktivierung über NKG2D möglich ist, fungiert NKG2D in T-Zellen, ähnlich wie CD28, als kostimulatorischer Rezeptor. Für die Aktivierung ist eine zusätzliche Stimulation durch T-Zellrezeptor nötig [31] [52] [86]. Es ist demnach anzunehmen, dass die frühe Aktivierung der T-Zellen nicht direkt über den NKG2D-vermittelten Signalweg erfolgte, sondern auf die NK-zellvermittelte Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen zurückzuführen ist. Um eine abschließende Aussage hierüber machen zu können, sollte diese These *in vitro* und *in vivo*, beispielsweise in Depletionsexperimenten, weiter untersucht werden.

Interessanter Weise zeigte sich eine Hochregulation von CD25 auf NK-Zellen und NKT-Zellen der Milz in beiden Kontrollgruppen, die eine Behandlung mit ULBP2-BB4 oder PBS erhielten. Die Deutung dieses Ergebnisses ist bisher unklar.

NK-Zellen können über verschiedene Wege aktiviert werden und nachfolgend die Lyse der Zielzellen vermitteln. Neben dem NKG2D-vermittelten Signalweg ist die Interaktion von sogenannten Todesliganden, wie TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*), auf der NK-Zelloberfläche mit TNF-Rezeptoren auf den Zielzellen möglich. Eine Bindung löst die Apoptose in der Zielzelle aus. Der TRAIL-vermittelte Signalweg unterstützt dabei die antitumorale Immunantwort der NK-Zellen [39] [69]. In der Analyse lag die

TRAIL-Expression auf allen Lymphozytentypen unterhalb des Detektionsniveaus. Folglich führte die ULBP2-aCEA-Behandlung zu keiner Induktion der TRAIL-Expression. TRAIL wird vor allem von aktivierten NK-Zellen exprimiert. Da die Analyse der Oberflächenmarker zeigt, dass sich die Lymphozyten zum Untersuchungszeitpunkt in einer frühen Aktivierungsphase befanden, ist denkbar, dass eine TRAIL-Hochregulation in einer längeren Therapiephase folgt.

Neben der Analyse der Aktivierungsmarker wurden die Anteile der einzelnen Zelltypen an der Gesamtlymphozytenpopulation untersucht. Dabei ist zu beachten, dass die CD69-Expression der Zellproliferation vorausgeht [12] [21]. Um die relativen Anteile der verschiedenen Zelltypen beurteilen zu können, wurden die Werte mit einem Basiswert verglichen, der sich aus den Mittelwerten von nicht-tumortragenden, unbehandelten Mäusen ergab. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Verteilung der verschiedenen Lymphozyten in der Gesamtpopulation. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Lymphozyten zum Zeitpunkt der Messung in einer frühen Phase der Aktivierung befunden haben. Sie sind gut vereinbar mit den Resultaten aus der Analyse der Aktivierungsmarker.

Möglicherweise erfolgte die Untersuchung der Lymphozyten zu einem Zeitpunkt, an dem die frühe Aktivierung schon detektierbar war, aber noch nicht vollständig ausreifen konnte. Ob dies in einer Proliferation, Ausbildung einer effektiven Immunantwort und letztendlich Hemmung der Tumorwachstums münden kann, lässt sich an dieser Stelle nicht beurteilen. Eine Wiederholung des Experiments mit längerem Therapieintervall und einer verlängerten Nachbeobachtung ist notwendig, um das Ergebnis abschließend bewerten zu können. Die Hypothese, dass der Immunligand ULBP2-aCEA prinzipiell fähig ist Lymphozyten *in vivo* zu aktivieren, konnte jedoch bestätigt werden.

4.2 Die Behandlung mit ULBP2-antiCEA beeinflusst die NKG2D-Expression nicht

Die Rolle des NKG2D-Rezeptors auf der NK-Zelloberfläche ist komplex [17] [139]. In der Regel vermittelt die Bindung von NKG2D-Liganden (NKG2DL) an NKG2D eine NK-Zellaktivierung. Die Existenz einer NKG2D-abhängigen, antitumoralen Immunantwort konnte *in vivo* und bei Patienten belegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass NKG2D-defiziente Mäuse empfänglicher für chemisch induzierte Tumore sind [55] [122]. Die artifizi-

elle Überexpression von NKG2DL führte hingegen zu einer verstärkten NK-Zellantwort [15] [30]. Auch bei Plasmozytom-Patienten korrelierte eine verminderte NKG2DL-Expression auf den Tumorzellen mit einer verminderten NK-Zellaktivität und einer Tumorprogression [10].

Allerdings kann die NKG2D-Rezeptorfunktion durch eine anhaltende Bindung von NKG2DL auch negativ beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine ubiquitäre NKG2DL-Expression *in vivo* eine NKG2D-Herunterregulation verursacht. Dies geht mit einer verminderten antitumoralen Immunantwort einher [26] [95] [142].

Weitergehend konnte für gastrointestinale und andere Tumore gezeigt werden, dass Tumorzellen lösliche NKG2DL über proteolytische Abspaltung (*shedding*) ins Serum abgeben [53] [111]. Dies scheint einen weiteren Mechanismus der Tumorzellen darzustellen, einer Immunantwort des Organismus zu entgehen. *Shedding* von NKG2DL führt zu einer verminderten NKG2D-Expression auf NK-Zellen und T-Zellen [53] [145]. Erhöhte Serumlevel löslicher NKG2DL konnten bei verschiedensten Tumorentitäten, unter anderem dem kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden [32] [66] [108] [109] [111] [138].

Nach der Behandlung mit ULBP2-aCEA kam es zu keiner verminderten NKG2D-Expression auf den NK-Zellen der Therapiegruppe. ULBP2-aCEA als löslicher Ligand scheint nicht mit dem NKG2D-Rezeptor zu interagieren und in keiner Inaktivierung zu resultieren. Die zusätzliche Bindung an CEA scheint für die Aktivierung der NK-Zellen nötig zu sein. Dies wird weiterhin bestätigt, da die Behandlung mit ULBP2-BB4, als Negativkontrolle, ebenfalls zu keiner Änderung der NKG2D-Expression führte. Auch auf der T-Zelloberfläche zeigte sich kein Unterschied in der NKG2D-Expression in Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies spricht dafür, dass die T-Zellaktivierung nicht direkt über NKG2D, sondern über eine NK-zellvermittelte Interaktion mit dendritischen Zellen vermittelt wurde.

4.3 ULBP2-antiCEA zeigt nur geringe Effekte auf die Tumorprogression

Die Tumorprogression wurde über den Therapiezeitraum mittels Biolumineszenz-Bildgebung (bioluminescence imaging, BLI) und manueller Messung des Tumorvolumens verfolgt. Dabei zeigte sich zwar ein Trend, aber kein signifikanter Einfluss der ULBP2-aCEA-Therapie auf das Tumorwachstum. Dieses Ergebnis lässt sich in Zusammenhang mit einer fehlenden Proliferation und der Abwesenheit von CD25 auf den Lymphozyten sehen. Es ist anzunehmen, dass sich die Lymphozyten zum Zeitpunkt der Messung noch in einer frühen

Aktivierungsphase befanden und sich folglich noch keine effektive Antwort des Immunsystems ausbilden konnte. Ein Einfluss auf die Tumorprogression scheint zu diesem Zeitpunkt unwahrscheinlich. Um beurteilen zu können, ob der frühen Aktivierung der Immunzellen tatsächlich eine effektive Immunantwort mit Proliferation und Differenzierung CEA-spezifischer T-Zellen folgt, ist eine Wiederholung des Experimentes mit einem längeren Therapieintervall und verlängertem Beobachtungszeitraum nötig. Um eine unspezifische Lymphozytenaktivierung über ULBP2-aCEA sicher ausschließen zu können, sollte dabei zusätzlich eine Gruppe von Mäusen mit CEA-negativen Tumoren (MC38) untersucht werden.

Die Biolumineszenz-Bildgebung ist ein elegantes Verfahren zur *in vivo* Überwachung der Tumorprogression. Eine Korrelation zwischen den BLI-Daten und dem Tumorvolumen wurde vielfach belegt und konnte auch in unseren Versuchen nachvollzogen werden [99] [147]. Die Biolumineszenz-Bildgebung ermöglicht eine nicht-invasive, longitudinale Messung der Tumorprogression. Außerdem können Mikrometastasen sensitiv erfasst werden [37].

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Biolumineszenz-Bildgebung ein zweidimensionales Verfahren ist. Tumore, die breit, aber wenig tief wachsen, können relativ zu groß erscheinen. Außerdem können Tumornekrosen, die keine Luciferase-Aktivität mehr besitzen, das tatsächliche Tumorvolumen zu gering erscheinen lassen. Weiterhin ist zu beachten, dass die Luciferase-Reaktion zeitabhängig ist, so dass sich die gemessenen Lichtemissionen mit der Zeit verändern. Die Luciferase-Injektion und die nachfolgende Biolumineszenz-Messung sollten daher in einem möglichst konstanten Zeitabstand erfolgen, um eine methodisch bedingte Varianz zwischen den einzelnen Messungen möglichst gering zu halten.

Trotz der genannten Nachteile ist die Biolumineszenz-Bildgebung ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung des Tumorwachstums *in vivo*. Ein großer Vorteil liegt sicherlich in der Möglichkeit das Tumorwachstum einzelner Tiere im zeitlichen Verlauf *in vivo* verfolgen zu können. Der Hauptvorteil gegenüber der manuellen Messung der Tumorvolumina liegt in der größeren Objektivität und besseren Visualisierbarkeit der Ergebnisse.

4.4 Aussichten: Immuntherapie mit rekombinanten Immunliganden

4.4.1 NK-zellbasierte Immuntherapie

NK-Zellen nehmen eine bedeutende Rolle in der immunologischen Kontrolle von Tumoren ein. Neben der Vermittlung direkter zytotoxischer Aktivität tragen NK-Zellen auch zur Bildung einer adaptiven Immunantwort bei und sind somit für die Entwicklung von Immuntherapien ein wichtiger Angriffspunkt [127]. NK-zellbasierte Therapien konnten in einzelnen klinischen Studien bereits erfolgreich eingesetzt werden [90] [107].

Eine NK-zellbasierte Therapie bietet im Vergleich zu T-zellbasierten Immuntherapien verschiedene Vorteile. Anders als bei der Rekrutierung von T-Zellen besteht bei NK-zellvermittelten Therapieansätzen ein geringeres Risiko einer unkontrollierten Proliferation der Effektorzellen, sowie einer unkontrollierbaren Zytokinfreisetzung (‚Zytokinsturm'), wie sie im Rahmen einer klinischen Studie mit einem Antikörperkonstrukt gegen den kostimulatorischen T-Zellrezeptor CD28 ausgelöst wurden [123]. Die Aktivierung von NK-Zellen stimuliert zwar die unmittelbare Lyse der Tumorzellen und nach Interaktion mit dendritischen Zellen auch eine adaptive Immunantwort, führt aber nicht zur Proliferation einzelner T-Zellklone, wie sie nach T-zellaktivierenden Therapien erfolgt. Weitergehend üben NK-Zellen inhibitorische Funktionen gegenüber anderen Effektorzellen aus [11] [104] [144]. So könnten NK-Zellen die Gefahr einer Induktion von Autoimmunreaktionen oder chronisch entzündlichen Reaktionen durch die Immuntherapie minimieren.

Tumorzellen zeigen häufig eine verminderte MHC I (*major histocompatibility complex I*)-Expression, um einer T-Zellantwort, die auf den MHC I-vermittelten Signalweg limitiert ist, zu entgehen. T-zellbasierte Therapiekonzepte zeigen folglich bei einer verminderten MHC I-Expression der Tumorzellen eine reduzierte Wirksamkeit. NK-zellvermittelte Therapieansätze hingegen sind unabhängig von einer MHC I-Präsentation.

Trotz erster erfolgreicher klinischer Studien ist das therapeutische Potential von NK-Zellen bislang nicht ausreichend genutzt [127]. Eine Limitierung der NK-Zellaktivierung wird auf die Inhibition der NK-Zellen nach der Interaktion mit den korrespondierenden MHC I-Antigenen bei gleichzeitiger Herunterregulation oder proteolytischer Abspaltung (*shedding*) der Liganden von aktivierenden NK-Zellrezeptoren auf den Tumorzellen zurückgeführt [110]. Die therapeutische Stimulation von aktivierenden NK-Zellrezeptoren ist ein

aussichtsreiches Therapiekonzept zur Umgehung dieses Mechanismus. Die Entwicklung bispezifischer Antikörper mit Spezifität gegen aktivierende Rezeptoren scheint hier ein chancenreicher Ansatz [65] [136].

4.4.2 Solide Tumore - Erreichbarkeit der Therapie?

Ein generelles Problem der Immuntherapie solider Tumoren liegt in der Zugänglichkeit des Zielantigens. Bei einer unzureichenden Vaskularisation des Tumorgewebes, könnte eine Lymphozytenmigration erschwert sein. Zentral gelegene Tumoranteile werden, aufgrund von Tumornekrosen, inhomogener Antigenverteilung sowie einem erhöhten interstitiellen Gewebedruck, möglicherweise nicht erreicht. Die Immunligand-basierte Therapie bietet hier einen Vorteil gegenüber Therapien mit monoklonalen Antikörpern. Das Molekulargewicht monoklonaler Antikörper liegt etwa bei 150 kDa [58]. Das ULBP2-aCEA-Konstrukt ist mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa deutlich kleiner, was die Penetration des Tumorgewebes vereinfachen könnte.

Soweit dies durch die BLI-Aufnahmen zu beurteilen ist, konnten in dem durchgeführten Versuch keine nekrotischen Bereiche beobachtet werden. Das Beurteilungsvermögen ist hier methodisch bedingt allerdings eingeschränkt. Um zu überprüfen, ob der Immunligand das Tumorgewebe erreicht und eine Lymphozytenmigration in das Tumorgewebe stattgefunden hat, sollen im Anschluss an diese Arbeit immunhistologische Färbungen der Tumorgewebe gemacht werden. Hierbei sollen insbesondere ULBP2-aCEA und Tumor-infiltrierenden Lymphozyten nachgewiesen werden.

4.4.3 Mögliche Nebenwirkungen der Immuntherapie

Die ULBP2-aCEA-Immuntherapie hat das Ziel eine spezifische Immunantwort gegen das CEA-Antigen auf der Tumorzelloberfläche zu generieren. Der erwünschte Toleranzverlust gegenüber CEA könnte die Induktion einer unerwünschten Autoimmunantwort gegen gesunde Kolonmukosa bewirken. Das Auftreten dieser Nebenwirkung muss überprüft werden.

Aufgrund der CEA-Expression auf gesunder Kolonmukosa bietet das verwendete Mausmodell die Möglichkeit, Nebenwirkungen der Immuntherapie *in vivo* zu überprüfen. Erste zu erwartende Anzeichen hierfür wären Änderungen der Stuhlgewohnheiten, wie sie auch bei Autoimmunprozessen oder chronisch entzündlichen Krankheiten des Darmes auftreten. Während des Experimentes konnten keinerlei Nebenwirkungen, im Sinne von Diar-

rhö, Blutbeimengungen im Stuhl oder Gewichtsabnahmen bei den Mäusen festgestellt werden. Das Auftreten von Nebenwirkungen muss natürlich weitergehen untersucht werden. Nach Opferung der Tiere in folgenden Versuchen sollte der Darm auf mögliche Entzündungs- oder Autoimmunprozesse untersucht werden.

Im Unterschied zu den Kolonkarzinom-Patienten befindet sich bei den transgenen Mäusen kein lösliches CEA im Serum der Mäuse. Bei einer klinischen Anwendung könnte die Therapie mit ULBP2-aCEA zu einer Immunkomplexbildung zwischen dem löslichen CEA und den Immunliganden führen. Als Folge könnte die gewünschte Wirkung der Therapie ausbleiben. Weitergehend ist es möglich, dass diese Immunkomplexe schwere Nebenwirkungen, im Sinne einer Typ III vermittelten Immunreaktion, hervorrufen. Diese Möglichkeit sollte weitergehend untersucht werden.

4.5 Weiterführende Versuche

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erste Hinweise auf die mögliche therapeutische Wirkung des Immunliganden ULBP2-aCEA. Ausgehend von den bisherigen Versuchen ergeben sich folgende neue Aspekte für eine Weiterführung der *in vivo* Experimente.

Der Aktivierungsstatus der Lymphozyten lässt vermuten, dass sich die Zellen in einer frühen Phase der Aktivierung befinden. Um eine effektive, adaptive Immunantwort zu generieren, sollte eine Erweiterung des Therapiezyklus mit einer verlängerten Nachbeobachtung der Mäuse geplant werden.

Es zeigte sich ein inhomogenes Wachstum der Tumore. Eine erneute Subklonierung der Zellen *in vitro* ist vorab zu diskutieren, um eine bessere Vergleichbarkeit der Mäuse untereinander zu gewährleisten.

Ziel der weiterführenden Untersuchungen ist die Prüfung der Hypothese, ob es zur Generierung einer spezifischen, adaptiven Immunantwort durch die NK-Zellen kommt. Zur funktionalen Messung der T-Zellaktivität eignen sich ELISpot-Untersuchungen [115].

In weitergehenden Experimenten sollte sichergestellt werden, dass die ULBP2-aCEA-Therapie keine unspezifische Lymphozytenaktivierung vermittelt. Erste Hinweise gibt hier die fehlende Aktivierung durch ULBP2-BB4, einem ULBP2-aCEA analogen Immunliganden, der jedoch keine Spezifität gegen CEA aufweist. Eine weitere Möglichkeit dies zu belegen, wäre der Versuch einer Behandlung von CEA-negativen Tumoren (MC38)

mit ULBP2-aCEA. Hier dürfte es durch die Therapie weder zu einer Lymphozytenaktivierung, noch zu einer Hemmung der Tumorprogression kommen.

Eine weitere Herausforderung für folgende Versuche wird sicherlich die effektive Produktion des Immunliganden sein. Das Protein konnte erfolgreich in großer Reinheit aufgereinigt werden und war nach einer Lagerung bei -80 °C weiterhin stabil. Die Gewinnung des Konstrukts ist bisher allerdings noch sehr zeit- und arbeitsintensiv.

5 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome zählen zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Menschen. Die chemotherapeutischen Möglichkeiten auf diesem Gebiet sind bisher begrenzt. Prognostisch entscheidend ist die vollständige chirurgische Resektion. Neuere Studien konnten die Bedeutung des Immunsystems bei der Kontrolle der Tumorprogression beim kolorektalen Karzinom belegen, so dass immuntherapeutische Behandlungsstrategien in den Fokus präklinischer Untersuchungen rücken.

In der vorliegenden Arbeit diente der aktivierende NK-Zellrezeptor NKG2D (*natural killer group 2 member D*) als Zielstruktur einer experimentellen Immuntherapie in einem Kolonkarzinom-Mausmodell. Der ‚Immunligand' ULBP2-antiCEA (ULBP2-aCEA), ein bispezifisches Protein, wurde als therapeutisches Agens eingesetzt. ULBP2-aCEA besitzt zwei unterschiedliche Bindungsregionen. Die Bindungsstelle *UL16 Binding Protein 2* (ULBP2) bindet spezifisch an NKG2D. Die zweite Bindungsstelle ist spezifisch für das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen überexprimiert wird. Der Immunligand wurde erfolgreich in 293T-Zellen transfiziert und aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die spezifische Bindung von ULBP2-aCEA an NKG2D und CEA^+ Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie *in vitro* nachgewiesen werden.

Um den Effekt von ULBP2-aCEA auf die NK-Zellen *in vivo* überprüfen zu können, wurde ein syngenes Mausmodell etabliert. Die CEA^+ murine Kolonkarzinomzelllinie MC38-CEA wurde stabil mit einem Luciferase-Gen transduziert (MC38-CEA(luc2)). Die MC38-CEA(luc2)-Zellen wurden erfolgreich in CEA-transgene Mäuse injiziert und die Tumorprogression mittels Biolumineszenz-Bildgebung *in vivo* verfolgt. Nach Anwachsen der Tumore und Behandlung der Mäuse mit ULBP2-aCEA erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der murinen Lymphozyten. In der Analyse zeigte sich eine deutliche Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-Zellen, T-Zellen und NKT-Zellen. Es zeigte sich keine verminderte NKG2D-Expression auf den Zellen, die auf eine Inaktivierung durch Bindung des löslichen NKG2D-Liganden hinweisen könnte.

Zusammenfassend ermöglicht der Immunligand ULBP2-aCEA die Aktivierung autologer Lymphozyten in einem syngenen Kolonkarzinom-Mausmodell. Die Behandlung mit ULBP2-aCEA stellt eine vielversprechende immuntherapeutische Möglichkeit dar.

6 Abstract

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world. Since chemotherapeutic treatments in this field are limited, a complete surgical resection is the central prognostic factor of patients' survival. Recent experimental studies highlight the role of the immune system in controlling the growth of colorectal cancers, so that immunotherapeutic strategies in this area are promising.

In this thesis the activating NK cell receptor NKG2D (*natural killer group 2 member D*), serves as a target of an experimental immunotherapy in a colon carcinoma mouse model. The 'Immunoligand' ULBP2-antiCEA (ULBP2-aCEA), a bispecific protein, was used as a therapeutic agent. ULBP2-aCEA has two binding regions. The *UL16 Binding Protein 2* (ULBP2) binds specifically to NKG2D. The second binding site is specific for CEA (*carcinoembryonic antigen*), which is overexpressed on the colon carcinoma cell surface. The Immunoligand was successfully transfected into 293T cells and purified from the supernatant. The specific binding of ULBP2-aCEA to NKG2D and CEA^+ cells was verified by flow cytometry analysis *in vitro*.

In order to investigate the anti-tumor activity of ULBP2-aCEA *in vivo,* a syngeneic mouse model was established. A CEA^+ murine colon carcinoma cell line MC38-CEA was stably transduced with the firefly luciferase gene (MC38-CEA(luc2)). MC38-CEA(luc2) cells were implanted subcutaneously into CEA transgenic mice and tumor growth was assessed using *in vivo* bioluminescence imaging. After tumor engraftment and ULBP2-aCEA therapy, the murine lymphocyte activation status was analyzed in flow cytometry. The results showed a clear upregulation of the activation marker CD69 on NK cells, T cells and NKT cells. No decreased expression of NKD2D was detected, which may point to an inactivation of the NK cells by the binding of soluble NKG2D ligands.

In summary, the Immunoligand ULBP2-aCEA enables the activation of autologous lymphocytes in a syngeneic colon carcinoma mouse model. Treatment with ULBP2-aCEA is a promising immunotherapeutic prospect and further preclinical research is required.

7 Literaturverzeichnis

[1] Atreya I and Neurath MF (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. Expert Rev Anticancer Ther. 8(4): 561-72

[2] Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H, Kohne CH, Ehninger G, Schmitz M and Bornhauser M (2006). Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. Cancer Immunol Immunother. 55(3): 268-76

[3] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 285(5428): 727-9

[4] Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarstrom S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M, Lin SH, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Obrink B, Shively JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watt S and Zimmermann W (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. Exp Cell Res. 252(2): 243-9

[5] Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K and Stanners CP (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. Cell. 57(2): 327-34

[6] Borg C, Terme M, Taieb J, Menard C, Flament C, Robert C, Maruyama K, Wakasugi H, Angevin E, Thielemans K, Le Cesne A, Chung-Scott V, Lazar V, Tchou I, Crepineau F, Lemoine F, Bernard J, Fletcher JA, Turhan A, Blay JY, Spatz A, Emile JF, Heinrich MC, Mecheri S, Tursz T and Zitvogel L (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. J Clin Invest. 114(3): 379-88

[7] Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG and Long EO (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. Blood. 107(1): 159-66

[8] Burnet M (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. Br Med J. 1(5022): 779-86

[9] Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH and Yokoyama WM (2002). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. J Immunol. 169(8): 4079-83

[10] Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B and Venuta S (2005). HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. Blood. 105(1): 251-8

[11] Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K and Zappacosta S (1999). Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. Eur J Immunol. 29(12): 4022-9

[12] Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A and Turano A (1997). Flow cytometric analysis of activation

markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. Cytometry. 27(1): 71-6

[13] Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO and Sanchez-Madrid F (1988). Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. J Exp Med. 168(5): 1621-37

[14] Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH and Lanier LL (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. Immunity. 12(6): 721-7

[15] Cerwenka A, Baron JL and Lanier LL (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(20): 11521-6

[16] Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A and Cosman D (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. Biochem Biophys Res Commun. 305(1): 129-35

[17] Champsaur M and Lanier LL (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. Immunol Rev. 235(1): 267-85

[18] Chan CH, Camacho-Leal P and Stanners CP (2007). Colorectal hyperplasia and dysplasia due to human carcinoembryonic antigen (CEA) family member expression in transgenic mice. PLoS One. 2(12): e1353

[19] Chan CH and Stanners CP (2004). Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. Mol Ther. 9(6): 775-85

[20] Clarke P, Mann J, Simpson JF, Rickard-Dickson K and Primus FJ (1998). Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy. Cancer Res. 58(7): 1469-77

[21] Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G and Gunsilius E (2003). Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. Immunobiology. 207(2): 85-93

[22] Clynes RA, Towers TL, Presta LG and Ravetch JV (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. Nat Med. 6(4): 443-6

[23] Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA and Moreno M (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer. 79(12): 2320-8

[24] Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M and Chalupny NJ (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. Immunity. 14(2): 123-33

[25] Cosulich ME, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F and Bargellesi A (1987). Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(12): 4205-9

[26] Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E and Held W (2005). Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. Blood. 106(5): 1711-7

[27] Craston R, Koh M, Mc Dermott A, Ray N, Prentice HG and Lowdell MW (1997). Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. J Immunol Methods. 209(1): 37-45

[28] Dalerba P, Maccalli C, Casati C, Castelli C and Parmiani G (2003). Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 46(1): 33-57

[29] Dhodapkar MV and Sanderson RD (1999). Syndecan-1 (CD 138) in myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. Leuk Lymphoma. 34(1-2): 35-43

[30] Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM and Raulet DH (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature. 413(6852): 165-71

[31] Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E and Raulet DH (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. Nat Immunol. 3(12): 1142-9

[32] Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B and Vyas YM (2003). Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. J Immunol. 171(12): 6891-9

[33] Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 22(329-60

[34] Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S and Zimmermann W (1994). Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. Cancer Res. 54(15): 4169-76

[35] Eagle RA, Flack G, Warford A, Martinez-Borra J, Jafferji I, Traherne JA, Ohashi M, Boyle LH, Barrow AD, Caillat-Zucman S, Young NT and Trowsdale J (2009). Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. PLoS One. 4(2): e4503

[36] Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I and Trowsdale J (2009). ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. Eur J Immunol. 39(11): 3207-16

[37] Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS and Contag CH (1999). Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. Neoplasia. 1(4): 303-10

[38] Ehrlich P (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneeskd. 5(273-90

[39] Falschlehner C, Schaefer U and Walczak H (2009). Following TRAIL's path in the immune system. Immunology. 127(2): 145-54

[40] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 127(12): 2893-917

[41] Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L and Munz C (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(47): 16606-11

[42] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM and Munz C (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. J Exp Med. 195(3): 343-51

[43] Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E and Zitvogel L (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nat Med. 5(4): 405-11

[44] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH and Pages F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science. 313(5795): 1960-4

[45] Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F and Stern PL (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. Immunol Today. 14(10): 491-9

[46] Germain C, Campigna E, Salhi I, Morisseau S, Navarro-Teulon I, Mach JP, Pelegrin A and Robert B (2008). Redirecting NK cells mediated tumor cell lysis by a new recombinant bifunctional protein. Protein Eng Des Sel. 21(11): 665-72

[47] Germain C, Larbouret C, Cesson V, Donda A, Held W, Mach JP, Pelegrin A and Robert B (2005). MHC class I-related chain A conjugated to antitumor antibodies can sensitize tumor cells to specific lysis by natural killer cells. Clin Cancer Res. 11(20): 7516-22

[48] Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G and Trinchieri G (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. J Exp Med. 195(3): 327-33

[49] Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA and Benson AB, 3rd (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. J Clin Oncol. 25(12): 1539-44

[50] Gold P and Freedman SO (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J Exp Med. 122(3): 467-81

[51] Granucci F, Zanoni I, Pavelka N, Van Dommelen SL, Andoniou CE, Belardelli F, Degli Esposti MA and Ricciardi-Castagnoli P (2004). A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. J Exp Med. 200(3): 287-95

[52] Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR and Spies T (2001). Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. Nat Immunol. 2(3): 255-60

[53] Groh V, Wu J, Yee C and Spies T (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature. 419(6908): 734-8

[54] Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO and Vajdic CM (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. Lancet. 370(9581): 59-67

[55] Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM and Raulet DH (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. Immunity. 28(4): 571-80

[56] Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI, Gazit R, Joseph A, Schjetne KW, Steinle A, Porgador A, Mevorach D, Goldman-Wohl D, Yagel S, LaBarre MJ, Buckner JH and Mandelboim O (2004). Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. J Clin Invest. 114(11): 1612-23

[57] Hara T, Jung LK, Bjorndahl JM and Fu SM (1986). Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. J Exp Med. 164(6): 1988-2005

[58] Harris M (2004). Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. Lancet Oncol. 5(5): 292-302

[59] Hefta SA, Hefta LJ, Lee TD, Paxton RJ and Shively JE (1988). Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(13): 4648-52

[60] Hicklin DJ, Marincola FM and Ferrone S (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. Mol Med Today. 5(4): 178-86

[61] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R and Kabbinavar F (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 350(23): 2335-42

[62] Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA and Stanners CP (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. Neoplasia. 4(2): 151-63

[63] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K and Nakachi K (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet. 356(9244): 1795-9

[64] Ishiguro F, Fukui T, Mori S, Katayama T, Sakakura N, Hatooka S and Mitsudomi T (2010). Serum carcinoembryonic antigen level as a surrogate marker for the evaluation of tumor response to chemotherapy in nonsmall cell lung cancer. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 16(4): 242-7

[65] Jachimowicz RD, Fracasso G, Yazaki PJ, Power BE, Borchmann P, Engert A, Hansen HP, Reiners KS, Marie M, von Strandmann EP and Rothe A (2011). Induction of in vitro and in vivo NK cell cytotoxicity using high-avidity immunoligands targeting prostate-specific membrane antigen in prostate carcinoma. Mol Cancer Ther. 10(6): 1036-45

[66] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S and Hayashi N (2005). Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. J Hepatol. 43(6): 1013-20

[67] Johansson MH, Bieberich C, Jay G, Karre K and Hoglund P (1997). Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene. J Exp Med. 186(3): 353-64

[68] Karre K, Ljunggren HG, Piontek G and Kiessling R (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. Nature. 319(6055): 675-8

[69] Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL and Vujanovic NL (1999). Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. J Immunol. 163(10): 5358-66

[70] Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H and Smyth MJ (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. Nat Immunol. 3(1): 83-90

[71] Kinugasa T, Kuroki M, Yamanaka T, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H and Matsuoka Y (1994). Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. Int J Cancer. 58(1): 102-7

[72] Koh CY, Blazar BR, George T, Welniak LA, Capitini CM, Raziuddin A, Murphy WJ and Bennett M (2001). Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. Blood. 97(10): 3132-7

[73] Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, Janssen E and Hoebe K (2009). NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. Blood. 113(26): 6593-602

[74] Kuespert K, Pils S and Hauck CR (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Curr Opin Cell Biol. 18(5): 565-71

[75] Kuroki M, Koga Y and Matsuoka Y (1981). Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. Cancer Res. 41(2): 713-20

[76] Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C and Phillips JH (1988). Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. J Exp Med. 167(5): 1572-85

[77] Lanier LL, Ruitenberg JJ and Phillips JH (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. J Immunol. 141(10): 3478-85

[78] Lee SH, Miyagi T and Biron CA (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. Trends Immunol. 28(6): 252-9

[79] Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, Rudikoff S, Pumphrey J, Robb RJ, Kronke M, Svetlik PB, Peffer NJ, Waldmann TA and et al. (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. Nature. 311(5987): 626-31

[80] Lesterhuis WJ, De Vries IJ, Schreibelt G, Schuurhuis DH, Aarntzen EH, De Boer A, Scharenborg NM, Van De Rakt M, Hesselink EJ, Figdor CG, Adema GJ and Punt CJ (2010). Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. Anticancer Res. 30(12): 5091-7

[81] Lieberman J (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol. 3(5): 361-70

[82] Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, Kim GJ, Wang YH, Ye Y, Sikora AG, Overwijk WW, Liu YJ, Wang G and Hwu P (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. J Clin Invest. 118(3): 1165-75

[83] Ljunggren HG and Karre K (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. J Exp Med. 162(6): 1745-59

[84] Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P and Sanchez-Madrid F (1993). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. J Exp Med. 178(2): 537-47

[85] Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P and Diefenbach A (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. Immunity. 26(4): 503-17

[86] Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE and Borrego F (2005). NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. J Immunol. 174(8): 4480-4

[87] Malarkannan S, Shih PP, Eden PA, Horng T, Zuberi AR, Christianson G, Roopenian D and Shastri N (1998). The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. J Immunol. 161(7): 3501-9

[88] McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, Trowsdale J and Durrant LG (2009). NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. Clin Cancer Res. 15(22): 6993-7002

[89] McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D and Dallaire BK (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol. 16(8): 2825-33

[90] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ and McGlave PB (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. Blood. 105(8): 3051-7

[91] Minami Y, Kono T, Miyazaki T and Taniguchi T (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. Annu Rev Immunol. 11(245-68

[92] Mlecnik B, Bindea G, Pages F and Galon J (2011). Tumor immunosurveillance in human cancers. Cancer Metastasis Rev.

[93] Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmuller G, Koszinowski U and Rocken M (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. Immunity. 19(4): 561-9

[94] Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH and Brahmi Z (1995). Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. Cell Immunol. 166(2): 236-46

[95] Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M and Hayday AC (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. Nat Immunol. 6(9): 928-37

[96] Ordonez C, Screaton RA, Ilantzis C and Stanners CP (2000). Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. Cancer Res. 60(13): 3419-24

[97] Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH and Galon J (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. 353(25): 2654-66

[98] Parham P (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nat Rev Immunol. 5(3): 201-14

[99] Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, Richer E, Corey DR, Antich PP and Mason RP (2004). Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. Mol Imaging. 3(2): 117-24

[100] Paxton RJ, Mooser G, Pande H, Lee TD and Shively JE (1987). Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(4): 920-4

[101] Peddareddigari VG, Wang D and Dubois RN (2010). The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. Cancer Microenviron. 3(1): 149-66

[102] Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L and Moretta A (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. J Exp Med. 190(10): 1505-16

[103] Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R and Moretta A (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. J Exp Med. 188(5): 953-60

[104] Piccioli D, Sbrana S, Melandri E and Valiante NM (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. J Exp Med. 195(3): 335-41

[105] Posner MC, Niedzwiecki D, Venook AP, Hollis DR, Kindler HL, Martin EW, Schilsky RL, Goldberg RM and Mayer RJ (2008). A phase II prospective multi-institutional trial of adjuvant active specific immunotherapy following curative resection of colorectal cancer hepatic metastases: cancer and leukemia group B study 89903. Ann Surg Oncol. 15(1): 158-64

[106] Puppa G, Sonzogni A, Colombari R and Pelosi G (2010). TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. Arch Pathol Lab Med. 134(6): 837-52

[107] Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH and Leung W (2010). NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 28(6): 955-9

[108] Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG and Steinle A (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. Blood. 102(4): 1389-96

[109] Salih HR, Goehlsdorf D and Steinle A (2006). Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. Hum Immunol. 67(3): 188-95

[110] Salih HR, Holdenrieder S and Steinle A (2008). Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. Front Biosci. 13(3448-56

[111] Salih HR, Rammensee HG and Steinle A (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. J Immunol. 169(8): 4098-102

[112] Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F and Cassidy J (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol. 26(12): 2013-9

[113] Sambrook J and Russell DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Auflage.

[114] Samy N, Ragab HM, El Maksoud NA and Shaalan M (2010). Prognostic significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: a short follow-up. Cancer Biomark. 6(2): 63-72

[115] Schmittel A, Keilholz U, Thiel E and Scheibenbogen C (2000). Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay. J Immunother. 23(3): 289-95

[116] Schrewe H, Thompson J, Bona M, Hefta LJ, Maruya A, Hassauer M, Shively JE, von Kleist S and Zimmermann W (1990). Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. Mol Cell Biol. 10(6): 2738-48

[117] Semino C, Angelini G, Poggi A and Rubartelli A (2005). NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. Blood. 106(2): 609-16

[118] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 410(6832): 1107-11

[119] Smith KA (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science. 240(4856): 1169-76

[120] Smyth MJ, Dunn GP and Schreiber RD (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. Adv Immunol. 90(1-50

[121] Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K and Yagita H (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2(11): 850-61

[122] Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM and Hayakawa Y (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. J Exp Med. 202(5): 583-8

[123] St Clair EW (2008). The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. J Clin Invest. 118(4): 1344-7

[124] Street SE, Cretney E and Smyth MJ (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood. 97(1): 192-7

[125] Tamir A, Basagila E, Kagahzian A, Jiao L, Jensen S, Nicholls J, Tate P, Stamp G, Farzaneh F, Harrison P, Stauss H, George AJ, Habib N, Lechler RI and Lombardi G (2007). Induction of tumor-specific T-cell responses by vaccination with tumor lysate-loaded dendritic cells in colorectal cancer patients with carcinoembryonic-antigen positive tumors. Cancer Immunol Immunother. 56(12): 2003-16

[126] Tartter PI, Steinberg B, Barron DM and Martinelli G (1987). The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. Arch Surg. 122(11): 1264-8

[127] Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N and Zitvogel L (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. Nat Immunol. 9(5): 486-94

[128] Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R and Santoni A (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. Immunol Today. 15(10): 479-83

[129] Thompson JA (1995). Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. Tumour Biol. 16(1): 10-6

[130] Trinchieri G (1989). Biology of natural killer cells. Adv Immunol. 47(187-376

[131] Vincent RG, Chu TM, Fergen TB and Ostrander M (1975). Carcinoembryonic antigen in 228 patients with carcinoma of the lung. Cancer. 36(6): 2069-76

[132] Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L and 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. J Exp Med. 187(12): 2065-72

[133] Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L and Moretta A (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. Blood. 106(2): 566-71

[134] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM and Ugolini S (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science. 331(6013): 44-9

[135] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T and Ugolini S (2008). Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 9(5): 503-10

[136] von Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS, Schnell R, Borchmann P, Merkert S, Simhadri VR, Draube A, Reiser M, Purr I, Hallek M and Engert A (2006). A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. Blood. 107(5): 1955-62

[137] Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, Stirpe F, Bast EJ and de Gast GC (1996). Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. Cancer Immunol Immunother. 42(6): 319-28

[138] Waldhauer I and Steinle A (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. Cancer Res. 66(5): 2520-6

[139] Waldhauer I and Steinle A (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene. 27(45): 5932-43

[140] Wallich R, Bulbuc N, Hammerling GJ, Katzav S, Segal S and Feldman M (1985). Abrogation of metastatic properties of tumour cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. Nature. 315(6017): 301-5

[141] Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L and Vivier E (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". Blood. 106(7): 2252-8

[142] Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee HG and Steinle A (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. J Immunol. 175(2): 720-9

[143] Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B and Dore JM (1996). A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. Br J Haematol. 94(2): 318-23

[144] Wilson JL, Heffler LC, Charo J, Scheynius A, Bejarano MT and Ljunggren HG (1999). Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. J Immunol. 163(12): 6365-70

[145] Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K and Plymate SR (2004). Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. J Clin Invest. 114(4): 560-8

[146] Ziegler SF, Levin SD, Johnson L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Baker E, Sutherland GR, Feldhaus AL and Ramsdell F (1994). The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. J Immunol. 152(3): 1228-36

[147] Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K, Lamar D, Kesterson RA, Wang X and Frank SJ (2008). Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. ILAR J. 49(1): 103-15

[148] Zitvogel L, Tesniere A and Kroemer G (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 6(10): 715-27

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Publikation

Jachimowicz RD, Fracasso G, Yazaki PJ, Power BE, Borchmann P, Engert A, Hansen HP, Reiners KS, **Madlener M**, von Strandmann EP, Rothe A (2011).

Induction of *in vitro* and *in vivo* NK cell cytotoxicity using high-avidity immunoligands targeting prostate-specific membrane antigen in prostate carcinoma.

Mol Cancer Ther. 10(6): 1036-45.

Poster

Madlener M, Rothe A, Jachimowicz RD, Reiners KS, Chatterjee S, Ullrich RT, Yazaki PJ, Engert A, von Strandmann E (2010).

A bispecific protein targeting the NKG2D receptor on natural killer cells: *in vitro* and *in vivo* activity of ULBP2-scFvCEA.

Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 116(21): 2095.

Ausgezeichnet als ASH Travel Award

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Wirkmechanismus der Immunliganden. 10
Abbildung 1.2: Fließschema der Versuchsabläufe. 11
Abbildung 2.1: Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin. 29
Abbildung 3.1: Auftrennung des ULBP2-aCEA-Konstrukts in einer SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau. 36
Abbildung 3.2: ULBP2-aCEA bindet simultan an MC38-CEA bzw. MC38-CEA(luc2) und NKG2D. 37
Abbildung 3.3: Luciferase-Assays der MC38-CEA(luc2)-Zelllysate (A) und in vitro Luciferase-Assay (B). 39
Abbildung 3.4: Biolumineszenz-Aufnahmen von 6 Mäusen in Bauchlage an den Tagen 13, 16, 20 und 23 nach subkutaner Injektion von 2 x 10^5 MC38-CEA(luc2)-Zellen in die rechte Flanke. 40
Abbildung 3.5: Korrelation zwischen dem BLI-Signal und Tumorvolumen. 41
Abbildung 3.6: Vergleich der Entwicklung des Tumorvolumens (schwarz, linke Ordinate) und des BLI-Signals (rot gestrichelt, rechte Ordinate) exemplarisch für 6 Mäuse. 42
Abbildung 3.7: Ablauf des Mausversuchs. 44
Abbildung 3.8: Oberflächenexpression von NKG2D, CD69, TRAIL und CD25 auf NK-Zellen, T-Zellen und NKT-Zellen im peripheren Blut und der Milz bei Therapie- (weiß) und Kontrollgruppe (dunkel, hellgrau), sowie dem Basiswert (schwarz). 46
Abbildung 3.9: Relative Zellzahlen der NK-Zellen, T-Zellen und NKT-Zellen im peripheren Blut und der Milz bei Therapie- (weiß) und Kontrollgruppe (dunkelgrau, hellgrau). 47
Abbildung 3.10: Verläufe des Tumorwachstums in der Therapie- (gestrichelte, rote Linie) und der Kontrollgruppe (durchgezogene, schwarze Linie) dargestellt in BLI-Werten und manuell ermittelten Tumorvolumina. 48

9.2 Formelverzeichnis

Formel 2.1: Formel zur Berechnung der Zellzahl. 18
Formel 2.2: Formel zur Annäherung des Tumorvolumens. 32

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zelllinien 13
Tabelle 2.2: Mauslinien 13
Tabelle 2.3: Anti-Human-Antikörper 13
Tabelle 2.4: Anti-Maus-Antikörper 14
Tabelle 2.5: Weitere Durchflusszytometrie-Reagenzien 14
Tabelle 2.6: Isotypen 14
Tabelle 2.7: Plasmide 14
Tabelle 2.8: ACK-Puffer 15
Tabelle 2.9: FACS-Puffer[3] 15
Tabelle 2.10: 293T-Medium 16
Tabelle 2.11: DMEM-Medium 16
Tabelle 2.12: RPMI-Medium 16
Tabelle 2.13: Kommerzielle Versuchssysteme 16
Tabelle 2.14: Zellkulturgeräte 17
Tabelle 2.15: Elektrophoresegeräte 17
Tabelle 2.16: Analysegeräte 17
Tabelle 2.17: PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Luciferase 2-DNA aus dem pGL4.30luc2-Plasmid. 21
Tabelle 2.18: Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer. 21
Tabelle 2.19: PCR-Programm zur Amplifizierung der Luciferase 2-DNA aus dem pGL4.30luc2-Plasmid. 22
Tabelle 2.20: Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus des pBabe(puro)-Plasmids. 22
Tabelle 2.21: Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus der Luciferase 2-DNA. 22
Tabelle 2.22: Reaktionsansatz der Ligation von pBabe(puro)- und Luc2-DNA. 23
Tabelle 2.23: Reaktionsansatz für die Sequenzierung des pBabe(puro)luc2-Plasmids. 25
Tabelle 2.24: Herstellung eines 10 %igen Trenngels. 26
Tabelle 2.25: Herstellung eines 5 %igen Sammelgels. 26
Tabelle 2.26: Pipettierschema des Bindungstests von ULBP2-aCEA an MC38-CEA und NKG2D. 27
Tabelle 2.27: Pipettierschema des Bindungstests von ULBP2-aCEA an MC38-CEA(luc2) und NKG2D. 28
Tabelle 2.28: Pipettierschema der ex vivo FACS-Analyse. 28
Tabelle 2.29: Mengen der verwendeten Antikörper der ex vivo FACS-Analyse. 29
Tabelle 3.1: Aufreinigungstabelle für den Immunoliganden ULBP2-aCEA. 35

10 Lebenslauf

Persönliches

Marie Elisabeth Madlener

geb. 4. Mai 1986 in Frankfurt am Main

Ausbildung

08/92 - 06/05	Grundschule und Gymnasium, Bad Vilbel Abschluss: Abitur (Note 1,2)
10/05 - 06/12	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
10/07	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,75)
06/12	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

Promotion

02/09 - 10/12	„Aktivierung von natürlichen Killerzellen in einem Kolonkarzinom-Mausmodell“ Labor für Immuntherapie bei Prof. Dr. rer. nat. Elke Pogge von Strandmann Klinik I für Innere Medizin, Universitätsklinik Köln
07/09 - 03/10	Forschungssemester

Stipendien und Auszeichnungen

06/05	Pierre de Coubertin Medaille, Schulsportpreis
10/09 - 04/10	Stipendiatin des SFB 832 Stipendiumprogramms
12/2010	ASH Travel Award

Praktika und Nebentätigkeiten

06/04	Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
09/05	Georg-Speyer-Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Frankfurt
07/08 - 01/10	Studentische Hilfskraft, Studienzentrum Infektiologie Universitätsklinik Köln
2008 - 2010	Famulaturen Neurologie, Innere Medizin, Chirurgie und Pädiatrie