

**Fc-optimierte NKG2D-Fusionsproteine zur Induktion von
NK-Zell Reaktivität gegen Leukämien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Baltz-Ghahremanpour, Katrin Miriam, geb. Baltz

2017

**Fc-optimierte NKG2D-Fusionsproteine zur Induktion von
NK-Zell Reaktivität gegen Leukämien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Baltz-Ghahremanpour, Katrin Miriam, geb. Baltz

2017

Tag der mündlichen Qualifikation: 29.07.2016
Dekan: Professor I. B. Autenrieth
1. Berichtersteller: Professor H.R. Salih
2. Berichtersteller: Professor D. B. Gallwitz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung.....	6
2.1 Das Immunsystem	6
2.2 Die Immunreaktion gegen Tumoren.....	8
2.3 NK-Zellen	11
2.4 NKG2D und seine Liganden	14
2.5 Fc-Rezeptoren.....	20
2.6 Leukämien	22
2.7 NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung der Leukämien.....	34
3 Material & Methoden.....	36
3.1 Material.....	36
3.2 Methoden	40
4 Ergebnisse	48
4.1 Generierung und Charakterisierung von NKG2D-Fc Fusionsproteinen	48
4.2 Modulation der NK-Zell-Reaktivität gegen NKG2DL-Transfektanten	53
4.3 Modulation der NK-Zell-Reaktivität gegen NKG2DL-tragende Zelllinien.....	55
4.4 Evaluation der NKG2D-Fc Fusionsproteine mit primären Leukämiezellen	59
4.5 Induktion von Degranulation autologer NK-Zellen durch die NKG2D-Fc Fusionsproteine	64
5 Diskussion	66
6 Literaturverzeichnis.....	71
7 Anhang	91
7.1 Abkürzungsverzeichnis	91
7.2 Tabellenverzeichnis	95
7.3 Abbildungsverzeichnis	96
7.4 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	98
7.5 Danksagung	99
7.6 Lebenslauf.....	102
7.7 Eigene Publikationen	102

1 Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) nehmen als zytotoxische Lymphozyten des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung maligner Erkrankungen, insbesondere von Leukämien ein. Ihre Reaktivität wird durch eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert, die über eine Vielzahl von Rezeptoren vermittelt werden, zu denen auch das aktivierende *Natural Killer Group 2D* (NKG2D)/NKG2D Liganden (NKG2DL) Molekülsystem gehört. Durch Applikation therapeutischer Antikörper, die *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) von NK-Zellen induzieren, wird diese Balance zu Gunsten einer Aktivierung von NK-Zellen verschoben. Aktuelle Therapieansätze zielen darauf ab, die Effektivität klinischer Antikörper durch Modifikation ihres Potentials, bei NK-Zellen ADCC auszulösen, zu verstärken. Gegenstand dieser Arbeit war die Modulation der NK-Zell-Reaktivität durch ein Fc-optimiertes NKG2D-Ig Fusionsprotein zu untersuchen.

Bisher publizierte Daten zur Expression von NKG2DL in Leukämien und deren Relevanz für die NKG2D-vermittelte Immunüberwachung sind zumindest teilweise widersprüchlich. Es konnte jedoch in Analysen von Zelllinien und Primärzellen von Leukämiepatienten gezeigt werden, dass NKG2DL in einem hohen Prozentsatz auf den malignen Zellen exprimiert werden, während gesunde CD34⁺ Vorläuferzellen keine Expression aufweisen. Die Blockade der NKG2D/NKG2DL-Interaktion verminderte die Zytotoxizität und IFN- γ Freisetzung von NK-Zellen gegen die Leukämiezellen, was die funktionelle Relevanz der NKG2DL-Expression auf leukämischen Zellen belegt.

Es wurde das Therapiekonzept entwickelt, NKG2DL in Anbetracht ihrer weitgehend auf maligne Zellen restringierten Expression als Zielmoleküle für eine Induktion von ADCC durch NK-Zellen gegen Leukämiezellen zu nutzen. Hierfür wurde ein NKG2D-IgG1 Fusionsprotein generiert, dessen Fc-Teil eine gesteigerte Affinität zum Fc-Rezeptor CD16 auf NK-Zellen aufweist (NKG2D-Fc-ADCC). Zur Charakterisierung seines Potentials zur Stimulation von NK-Zellen wurden zwei weitere Varianten generiert und vergleichend untersucht: NKG2D-Fc-WT, ein Fusionsprotein ohne Modifikationen im Fc-Teil, und NKG2D-Fc-KO, bei welchem die Affinität des Fc-Teils zum Fc-Rezeptor aufgehoben wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Fc-Teile der NKG2D-Fc Fusionsproteine wie erwartet stark unterschiedliche Effekte auf die Reaktivität von NK-Zellen haben. Während mit dem NKG2D-Fc-KO keine Induktion von ADCC, sondern eine Inhibierung der NKG2D-vermittelten NK-Zell-Reaktivität durch Blockierung der NKG2D/NKG2DL-Interaktion zu beobachten war, konnte mit NKG2D-Fc-WT eine durch ADCC-Induktion vermittelte Steigerung der Reaktivität von NK-Zellen erreicht werden. Die ADCC-Optimierung des Fusionsproteins NKG2D-Fc-

ADCC bewirkte eine im Vergleich zum NKG2D-Fc-WT deutliche Verstärkung der Effektorfunktionen von NK-Zellen gegen Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen, hier sowohl im allogenen als auch im autologen System. Im Falle der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) konnten wir diese differentiellen Effekte der unterschiedlichen NKG2D-Fc Fusionsproteine auch in Anwesenheit des therapeutisch eingesetzten anti-CD20 Antikörpers Rituximab beobachten. Die Spezifität der durch die NKG2D-Fc Fusionsproteine induzierten Effekte wurde dadurch belegt, dass diese nur gegen NKG2DL-positive Tumorzellen eine Reaktivität von NK-Zellen induzieren, nicht jedoch gegen gesunde (NKG2DL-negative) Zielzellen.

Insgesamt konnte in dieser Dissertation die Rolle des NKG2D/NKG2DL-Molekülsystems bei der Immunüberwachung von Leukämien durch NK-Zellen im Vergleich zu bereits vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Durch die Entwicklung Fc-optimierter NKG2D-Fc Fusionsproteine wurde ein Konzept entwickelt, die tumorrestrikingierte Expression von NKG2DL in Patienten mit AML therapeutisch zu nutzen.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat.: immunis = „frei; rein, unberührt“) umfasst die Gesamtheit aller Organellen, Zellen und Proteine, die dem Organismus zur Abwehr von Mikroorganismen und Fremdstoffen, aber auch zur Eliminierung abnormaler Körperzellen dienen. Wesentliche Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit, körpereigene von körperfremden oder veränderten Strukturen zu unterscheiden, damit sich die Immunreaktionen nicht gegen Bestandteile des gesunden Organismus richten. Das Immunsystem der Vertebraten hat sich im Zuge der Evolution zu einer komplexen Zusammenstellung von Abwehrmechanismen entwickelt, die sich in zelluläre und humorale Bestandteile untergliedern lassen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Unterteilung der Komponenten des Immunsystems.

Leukozyten bilden den zellulären Teil des Immunsystems. Diese entstammen entweder der myeloischen Reihe – Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) – oder sind Komponenten der lymphatischen Reihe – B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Das humorale Immunsystem umfasst eine Vielzahl löslicher Faktoren, die an einer Immunreaktion beteiligt sind. Hierzu zählen neben dem Komplementsystem, Zytokinen und Lysozym auch die von B-Zellen produzierten Antikörper. Eine andere Einteilung zielt auf die Ursache der Aktivierung ab. Diese untergliedert das Immunsystem mit seinen verschiedenen Komponenten in einen angeborenen und einen adaptiven Teil.^{1,2}

2.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigung des Organismus. Sie ist innerhalb der ersten Minuten und Stunden verantwortlich für die Erkennung von Krankheitserregern, welche die natürlichen Barrieren des Körpers überwinden konnten. Hierbei spielen sowohl verschiedene humorale als auch zelluläre Komponenten eine Rolle.

Zu den humoralen Faktoren gehören bakterizid wirkende Substanzen wie Lysozym oder die zahlreichen verschiedenen Proteine des Komplementsystems, die nach ihrer Aktivierung körperfremde Zellen direkt angreifen oder für Immunzellen markieren (Opsonierung). Ein weiterer Bestandteil der angeborenen humoralen Immunantwort ist eine Vielzahl von Zytokinen, die vor allem zum Anlocken und der Aktivierung zellulärer Bestandteile des Immunsystems dienen.

Zu den zellulären Strukturen der angeborenen Immunität gehören die Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Dendritischen Zellen und NK-Zellen. Phagozytierende Zellen werden vor allem durch PRR's (*pattern recognition receptors*) auf ihrer Oberfläche aktiviert, welche konservierte Struktur motive pathogener Mikroorganismen erkennen, die auf Eukaryonten nicht vorkommen.³⁻⁵ Diese Zellen phagozytieren die Mikroorganismen und alarmieren parallel das Immunsystem, indem sie inflammatorische Mediatoren frei setzen und so eine Entzündungsreaktion auslösen.⁶ Letztere führt u.a. zur Aktivierung von Bestandteilen des adaptiven Immunsystems. Eine besondere Stellung zwischen angeborener und adaptiver Immunität nehmen Dendritische Zellen ein, die nach der Phagozytose Antigene prozessieren, den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren und so eine adaptive Immunreaktion auslösen.

Die Funktion von NK-Zellen als weiterer Komponente der angeborenen Immunität wird in späteren Abschnitten detailliert beschrieben.

2.1.2 Die adaptive Immunität

Im Gegensatz zu Zellen der angeborenen Immunität, die ihre Zielzellen über eine begrenzte Anzahl keimbahnkodierter Rezeptoren erkennen, beruht die Erkennung von Pathogenen bei Zellen der adaptiven bzw. spezifischen Immunität auf einer praktisch unbegrenzten Zahl verschiedener Antigen-Rezeptoren mit jeweils einzigartiger Spezifität. Diese Antigen-Rezeptoren – B-Zell-Rezeptoren bzw. deren Antikörper und T-Zell-Rezeptoren – gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und entstehen durch somatische Rekombination von keimbahnkodierten Genfragmenten.⁷⁻¹⁰ Ein besonderes Merkmal der spezifischen Immunität ist zudem die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch der Organismus vor einer erneuten Erkrankung, ausgelöst durch das gleiche Pathogen, geschützt wird. Wie das

angeborene Immunsystem verfügt auch die adaptive Immunität über humorale und zelluläre Abwehrmechanismen.

Für die zelluläre Immunantwort der adaptiven Immunität sind T-Zellen verantwortlich: sie erkennen Antigene, die als Peptide an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) gebunden sind.¹¹ Der Kontakt mit einem spezifischen MHC-gebundenen Antigen (MHC-Restriktion) auf einer antigen-präsentierenden Zelle (APC), induziert – in Kombination mit einem zweiten Stimulus (Kostimulation) – die Entwicklung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen. Aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer Funktion unterscheidet man im Wesentlichen zwei Arten von T-Zellen. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen und können virusinfizierte oder maligne Zellen lysieren.^{12,13} CD4⁺ T-Zellen erkennen dagegen Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen und entwickeln sich z.B. zu T-Helferzellen.¹⁴

Die humoralen Abwehrmechanismen der adaptiven Immunität werden durch B-Zellen vermittelt. Diese nehmen Antigene über den membranständigen B-Zell-Rezeptor auf und präsentieren diese über MHC-Klasse-II-Moleküle T-Helferzellen.¹⁵ Nach ihrer Aktivierung durch die T-Zelle differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen aus und produzieren Antikörper gegen das Antigen.

2.2 Die Immunreaktion gegen Tumoren

Die Idee einer Immunreaktion gegen Tumoren formulierte bereits Paul Ehrlich vor mehr als 100 Jahren. Er postulierte, dass das Immunsystem den Körper auf die Anwesenheit „aberranter Keime“ überwacht und diese eliminiert.¹⁶ Trotzdem stellen Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar. Neben der chirurgischen Entfernung des Tumors zählen die Strahlen- und Chemotherapie zu den Standardmethoden bei der Behandlung maligner Erkrankungen. Es gelang, diese in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zu verbessern. Sie werden aber weiterhin häufig von starken Nebenwirkungen begleitet und sind, abhängig von der Tumorentität und ggf. disseminierenden Krankheitsverläufen, in ihrer Wirksamkeit begrenzt. Große Hoffnungen beruhen deshalb auf der Idee, eine Immunreaktion spezifisch gegen Tumorzellen zu induzieren.

Die Fähigkeit des Immunsystems, maligne Zellen zu erkennen und zu vernichten und damit die Entwicklung von Krebs in einem immunkompetenten Organismus zu verhindern, wurde als Hypothese der Immunüberwachung (*immune surveillance*) erstmals 1967 von Burnett und Thomas postuliert.^{17,18} In den folgenden Jahren wurde diese Hypothese jedoch stark angezweifelt, da in Studien mit immundefizienten Mäusen keine erhöhte Tumorzinzidenz

nachgewiesen werden konnte.^{19,20} Weitere Studien mit Mäusen, die einen genetischen Defekt in der Signalübertragung von IFN- γ tragen, und mit Mäusen ohne B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen (Rag2^{-/-}) wiesen jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für Karzinogen-induzierte und spontane Tumoren auf.²¹⁻²³ Zudem konnte mit syngenen Mäusen die Immunogenität von Tumorzellen eindeutig belegt werden. So konnte das Wachstum transplanteder Tumore durch vorherige Immunisierung mit Krebszellen gleichen Ursprungs verhindert werden. Außerdem wiesen die Mäuse eine Anreicherung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen auf.²⁴ Dies wurde durch den Nachweis einer tumorspezifischen Lyseaktivität mit humanen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten bestätigt.²⁵⁻²⁷

Heute geht man davon aus, dass die Ausbreitung eines Tumors durch Wachstum und metastatischer Streuung stark von der Fähigkeit abhängig ist, dem Immunsystem des Organismus zu entgehen. Das Versagen der Immunüberwachung scheint eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines klinisch apparenten Tumors nach initialer onkogener Transformation einer Zelle zu sein.²⁸ Liegt ein Tumor vor, konnte das Immunsystem offensichtlich die malignen Zellen nicht hinreichend erkennen und/oder bekämpfen, da die Immunreaktionen ineffektiv sind oder weil sie von den Tumorzellen aktiv umgangen werden. Die Fähigkeit der Immunevasion wird aktuell als siebtes Kennzeichen von Tumorzellen (*hallmark of cancer*) diskutiert.²⁸⁻³⁰ Eine suffiziente Immunantwort dagegen kann nicht nur Metastasierung begrenzen oder sogar verhindern, sondern spielt auch für viele erfolgreiche therapeutischen Interventionen wie Antikörpertherapien oder allogene Stammzelltransplantationen eine wichtige Rolle.

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl humoraler und zellulärer Mechanismen nachgewiesen werden, durch welche Krebszellen sich einer wirksamen Immunantwort entziehen (*immune escape*).

Im Mikromilieu von Tumoren spielen viele humorale Faktoren eine wichtige Rolle. So beeinflussen z.B. Zytokine durch direkte Effekte auf die Immuneffektorzellen, Regulation der Produktion und Funktion weiterer Zytokine oder durch Modulation der Expression von Adhäsions- oder kostimulatorischen Molekülen die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen.³¹⁻³⁶ Tumorzellen sezernieren u.a. die immunsuppressiven Botenstoffe TGF (*transforming growth factor*)- β ³⁷ und IL-10.³⁸⁻⁴¹ IL-10 hemmt die Produktion verschiedener aktivierender Zytokine und Chemokine wie IFN- γ , IL-2 oder TNF (Tumornekrosefaktor)^{42,43} und hat direkt suppressive Effekte auf die Aktivität von T-Zellen.³¹ Auch die Sekretion von TGF- β durch neoplastische Zellen ist als Ursache für eine Immunsuppression durch Tumoren beschrieben worden. TGF- β hemmt z.B. die Expression von IFN- γ und die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen, sowie die Aktivierung von Makrophagen.^{44,45} In

Melanompatienten korreliert der TGF- β -Spiegel mit der Progression der Erkrankung³¹ und bei Magenkarzinomen mit einem Abfall der NK-Zell-Aktivität.⁴⁶

Einen weiteren möglichen *immune escape*-Mechanismus stellt die reduzierte und/oder veränderte Expression von immunmodulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen dar. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind die MHC-Klasse-I-Moleküle, für welche in verschiedenen Tumoren eine deutlich reduzierte Expression auf der Zelloberfläche beschrieben wurde.⁴⁷⁻⁵⁰ Bei einigen Tumoren konnte eine Assoziation zwischen der Herabregulation der Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen und einer schlechteren Prognose beobachtet werden.⁵¹⁻⁵⁵ Da eine Vielzahl von verschiedenen intrazellulären Peptiden um ein bestimmtes MHC-Klasse-I-Allel konkurrieren, ist durchaus vorstellbar, dass ab einer gewissen Reduktion der MHC-Expression nicht alle möglichen endogenen Epitope mit ausreichender Dichte exprimiert werden können. Dies ermöglicht den Tumorzellen einen *immune escape*. Insbesondere in wenig immunogenen Tumoren könnte so eine Reduktion von MHC-Klasse-I den komplexen Prozess der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen beeinflussen. Bei einigen Tumoren kommt es zu einem völligen Verlust der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, was meist auf Mutationen des β 2-Mikroglobulins zurückzuführen ist.^{56,57} Auch bestimmte Punktmutationen, Gendeletionen und Veränderungen in der transkriptionellen Regulation können zum Verlust einzelner MHC-Allele führen.⁵⁷

Auch eine alterierte Expression anderer immunregulatorischer Oberflächenmoleküle stellt einen Mechanismus dar, mit welchem sich Tumorzellen der Kontrolle des Immunsystems entziehen können. Zum Beispiel können Tumorzellen durch reduzierte Expression von Molekülen, die das Immunsystem stimulieren, der Immunüberwachung entkommen. Dabei stellt das *Shedding* einen wichtigen Mechanismus dar, bei dem Oberflächenmoleküle von der Zellmembran abgeschnitten und so in löslicher Form freigesetzt werden.⁵⁸⁻⁶³ Neben der resultierenden Reduktion der Oberflächenexpression können die freigesetzten Liganden auch durch Blockierung/Maskierung oder Herabregulation der entsprechenden Rezeptoren, sowie eine möglicherweise veränderte Funktion die Immunantwort negativ beeinflussen.^{64,65}

Ein in den letzten Jahren intensiv erforschtes Beispiel hierfür ist die Freisetzung von Liganden für den aktivierenden Immunrezeptor NKG2D, auf welchen nachfolgend noch eingegangen wird. Auch eine erhöhte Expression von Molekülen, die Immuneffektorzellen hemmen oder ggf. sogar abtöten, wurde auf malignen Zellen nachgewiesen. So wurde für PD-L1 (*programmed death ligand 1*) eine immuninhibierende Wirkung gegenüber T-Zellen durch Expression auf zahlreichen malignen Zellen identifiziert.⁶⁶⁻⁷²

In den letzten Jahren belegten zahlreiche Arbeiten eine wichtige Rolle der NK-Zellen bei der Immunreaktion gegen Tumorzellen. Die Beeinflussung der NK-Zell-vermittelten

Immunüberwachung von Tumoren durch NKG2DL in oberflächengebundener Form und deren Modulation war Teil dieser Promotion und wird nachfolgend im Detail beschrieben.

2.3 NK-Zellen

NK-Zellen wurden erstmals 1975 als zytotoxische Lymphozyten beschrieben, die in der Lage sind, Tumorzellen ohne vorhergehende Sensibilisierung zu lysieren.⁷²⁻⁷⁵ Aufgrund der fehlenden Spezifität für ein Antigen, aber des gemeinsamen Ursprungs mit T- und B-Lymphozyten aus einer CD34⁺ Vorläuferzelle war die Zuordnung der NK-Zellen lange unklar. NK-Zellen werden aber inzwischen der angeborenen Immunität zugerechnet.⁷⁶ Die Aktivierung von NK-Zellen wird von einer Vielzahl inhibierender und aktivierender Rezeptoren bestimmt.^{77,78} Diese Aktivierung von NK-Zellen wird in der *missing-self*-Hypothese und *induced-self*-Hypothese beschrieben. Die *missing-self*-Hypothese postuliert, dass NK-Zellen aktiviert werden und eine Zielzelle lysieren, wenn diese keine oder eine nur unzureichende Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche aufweist.⁷⁸⁻⁸¹ Nach Erkennen der MHC-Klasse-I Moleküle werden über spezifische inhibierende NK-Zell-Rezeptoren hemmende Signale in die NK-Zelle geleitet.⁸² Zellen mit ausreichender Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle entgehen daher einer Lyse durch NK-Zellen. Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen kann jedoch z.B. durch virale Infektion oder im Laufe einer malignen Entartung heruntergeregelt werden. Somit entfallen die hemmenden Signale und die Zielzelle kann von NK-Zellen lysiert werden. In einem gesunden Organismus gibt es jedoch auch Zellen, die keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen aufweisen und dennoch nicht lysiert werden, wie zum Beispiel Erythrozyten. Mittlerweile ist klar, dass eine Aktivierung von NK-Zellen nicht nur durch Fehlen inhibitorischer Signale bewirkt wird, sondern auch eine Stimulation von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren durch Liganden auf den Zielzellen erfolgen muss, deren Expression durch Stress oder maligne Transformation induziert werden kann (*induced-self*). Daher entscheidet die Gesamtheit aus aktivierenden und inhibitorischen Signalen über die Induktion der Reaktivität von NK-Zellen.⁷⁸

Neben ihrer Fähigkeit Zielzellen zu lysieren, spielen NK-Zellen auch als *early source of IFN- γ* eine wichtige Rolle.^{78,83} Die Produktion dieses Zytokins nach Kontakt mit Zielzellen trägt, neben der direkten proliferationshemmenden Wirkung und Förderung von Apoptose bei den Zielzellen, vor allem durch die Stimulation nachfolgender adaptiver Immunreaktionen zur Eliminierung von Zielzellen bei.⁸⁴

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass Tumorzellen in der Maus, aber auch frisch isolierte humane Tumorzellen, spontan durch NK-Zellen getötet werden können.⁷⁹ Darüber

hinaus konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen an der Eliminierung von induzierten oder spontan entstehenden Tumoren beteiligt sind.⁸⁵ Bei Tumorpatienten konnte nach Behandlung mit IL-2 ein Zusammenhang von NK-Zell-Reaktivität und dem Ansprechen auf die Therapie festgestellt werden.⁸⁶ Zudem belegen klinische Daten die große Bedeutung von NK-Zellen bei der Immunüberwachung maligner hämatopoetischer Erkrankungen. So wird beispielsweise nach haploidenter Stammzelltransplantation durch einen *mismatch* der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Leukämiezellen des Rezipienten und den MHC-Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren auf den Donor-NK-Zellen eine Alloreaktivität der NK-Zellen generiert. In diesem allogenen Kontext erfolgt eine Aktivierung von NK-Zellen, die einen erhöhten Schutz vor Rezidiven der Leukämie bewirkt und das *engraftment* des Transplantats verbessert, ohne *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) zu verursachen.⁸⁷ Es ist daher auch von hoher klinischer Relevanz, Molekülsysteme, die an der Regulation der Reaktivität von NK-Zellen, speziell gegen Tumorzellen, beteiligt sind zu charakterisieren.^{1,2}

2.3.1 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren

Zu den hemmenden NK-Zell-Rezeptoren gehören im Menschen viele Mitglieder der MHC-Klasse-I-spezifischen Rezeptoren der sogenannten KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*)-Familie und der C Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (CTLR), vor allem CD94/NKG2A Heterodimere. Ein gemeinsames Merkmal von einigen „klassischen“ inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren sind sogenannte ITIM (*immunoreceptor-tyrosine-based inhibition motifs*) innerhalb ihrer zytoplasmatischen Domäne, wobei die Anzahl der ITIM bei verschiedenen Rezeptoren variiert.⁹¹ Nach Bindung des Liganden werden die ITIM durch src-Kinasen phosphoryliert und können ihrerseits wiederum Phosphatasen wie SHP-1 und -2 (*SH2-domain-containing-protein tyrosine phosphatase 1* und *2*) rekrutieren und durch Dephosphorylierung aktivieren. Folglich werden Signalmoleküle von aktivierenden Signalwegen inaktiviert.^{92,93} KIRs sind spezifisch für allelische Varianten von HLA-A, -B und -C Molekülen.^{92,94,95} NK-Zellen exprimieren oft ein oder zwei selbst-restringierte KIRs, während eine Koexpression von mehreren selbst-restringierten KIRs selten auftritt. Das Heterodimer CD94/NKG2A erkennt die nicht-klassischen MHC-Moleküle HLA-E und Qa-1b, und dieser inhibitorisch wirkende Komplex wird von einem Großteil der NK-Zell-Population exprimiert.⁹⁶ Auch der Leukozyten Immunglobulin-ähnliche Rezeptor LIR-1 (ILT-2) kann nach Bindung verschiedener Liganden inhibierend wirken.⁹⁷ Es gibt zahlreiche weitere inhibitorische NK-Zell Rezeptoren, die sich verschiedenen Familien wie der TNF-Rezeptor-Superfamilie z.B. GITR⁹⁸⁻¹⁰⁰, 4-1BB^{101,102} zuordnen lassen, Mitglieder der B7-Familie (z. B.

4IgB7-H3¹⁰³) oder bestimmte Glycan-bindende Moleküle wie die Sialin-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine (Siglecs) und IRp60 (CD300a).^{104,105}

2.3.2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren

Zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren gehören die meisten der bisher bekannten Mitglieder der natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor (*Natural Cytotoxicity Receptor, NCR*)-Familie. Die beiden Vertreter NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) sind sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten NK-Zellen nachweisbar. Ihre Expressionsdichte korreliert mit der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. NKp44 (NCR2) hingegen konnte nur nach Aktivierung auf der Oberfläche von NK-Zellen detektiert werden.¹⁰⁶ Signale dieser aktivierenden Rezeptoren werden durch ITAM (*immunoreceptor-tyrosine-based activation motifs*) der jeweiligen Adapterproteine (CD3 ζ für NKp46, Fc ϵ RI γ für NKp30 oder DAP12 für NKp44) in der Zelle vermittelt.¹⁰⁷ Während bereits nachgewiesen wurde, dass die NCR eine wichtige Rolle bei NK-Zell-Reaktionen gegen Tumoren spielen, sind ihre Liganden bislang noch unzureichend charakterisiert. Nkp46 erkennt Heparansulfat-Proteoglykane, Vimentin und einige virale Proteine. BAG6 und B7-H6, welches von verschiedenen Tumorzellen, nicht jedoch von gesunden Zellen exprimiert wird,¹⁰⁸ sind Liganden für NKp30. Erst kürzlich wurde NKp44L, eine neue Isoform des *Mixed-Lineage Leukemia 5* (MLL5)-Proteins, als Ligand für NKp44 identifiziert.¹⁰⁹

Eine besonders wichtige Rolle bei der NK-Zell-Aktivierung kommt dem Fc-gamma Rezeptor III (CD16) zu, dessen alleinige Stimulation zur Induktion einer starken NK-Zell-Reaktivität ausreicht.¹¹⁰ Auf die die Fc-Rezeptoren wird nachfolgend noch im Detail eingegangen. Weitere bekannte aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen sind die Toll-like Rezeptoren (TLR), die Immunglobulin Superfamilie-Mitglieder 2B4 (CD244) und DNAM-1 (CD226) und CD2.^{80,111} Auch Vertreter der KIR und C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren stellen aktivierende NK-Zell-Rezeptoren dar. Die funktionelle Bedeutung der MHC-Klasse-I-spezifischen aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren ist bis heute nur unzureichend verstanden.⁹¹ So kann z.B. KIR2DS1 nach Erkennung von HLA-C NK-Zellen aktivieren.^{112,113} AICL (*activation induced C-type lectin*) wurde als Ligand für den aktivierenden Rezeptor Nkp80 identifiziert.¹¹⁴ Der zum inhibitorischen Heterodimer CD94/NKG2A aktivierende Gegenpart CD94/NKG2C, welchem das ITIM fehlt, assoziiert über seine Transmembrandomäne mit dem Adapterprotein DAP12. Die Signaltransduktionsmechanismen der aktivierenden Rezeptoren sind vielfältig und werden über verschiedene Adaptermoleküle, wie etwa die CD3-Kette, die Fc γ -Kette oder DAP12, Phosphatasen und Kinasen reguliert.^{78,115}

Der aktivierende Immunrezeptor NKG2D stellt einen der am besten charakterisierten Rezeptoren der NK-Zellen dar und spielt in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle, weshalb dieser im Folgenden detailliert beschrieben wird.

2.4 NKG2D und seine Liganden

2.4.1 NKG2D

NKG2D (*Natural Killer Group 2D*, KLRK1, CD314) ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer extrazellulären C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne und wird im NK-Gen-Komplex (*NK gen complex*, NKC) auf Chromosom 12 des Menschen (p12.2-p12.3) und dem murinen Chromosom 6 kodiert.¹¹⁶ Die Sequenz stimmt allerdings nur zu etwa 20% mit den Sequenzen der anderen NKG2-Proteine (NKG2A/B, NKG2C, and NKG2E) überein.^{78,117,118} Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der NKG2-Familie, die Heterodimere mit CD94 bilden, bildet NKG2D Homodimere und erkennt eine Vielzahl stress-induzierter MHC-Klasse I-ähnlicher Liganden (NKG2DL).¹¹⁶ Im Menschen wird NKG2D auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und NKT-Zellen als direkt aktivierendes oder kostimulatorisches Molekül exprimiert.¹¹⁹ NKG2D spielt eine wichtige Rolle für die direkte Aktivierung der NK-Zell-Reaktivität.^{116,120} In T-Zellen übernimmt NKG2D kostimulatorische Aufgaben. Die NKG2D-Expression kann durch verschiedene Zytokine moduliert werden. So führen z.B. IL-2, IL-15, TNF und IFN- α zu einer Hochregulation des Rezeptors,^{78,121,122} während die Gegenwart von TGF- β , IFN- γ und IL-21 die Expression von NKG2D herunterregulieren können.¹²³⁻¹²⁵ Diese Zytokine können von verschiedenen Immunzellen sezerniert werden und damit die NKG2D-vermittelte Aktivität von NK-Zellen beeinflussen. In Mausmodellen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine anhaltende Stimulation von NKG2D durch Bindung membranständiger Liganden zur Herabregulation des Rezeptors führt.^{126,127}

Der humane homodimere NKG2D-Rezeptor formt mit den Adapterproteinen DAP10 einen hexameren Immunrezeptorkomplex, über den nach Phosphorylierung des Tyr-Ile-Asn-Met Motives der zytoplasmatischen Domäne des DAP10 Adapters, der PI-3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalweg und Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*)-Vav-Signalweg induziert werden.¹²⁸⁻¹³⁰ Neben PI-3-K und Grb2-Vav1 spielen auch SLP76, GTPasen (Rho- und Rac-Familie) und die Phospholipase-C γ 2 eine Rolle in der NKG2D-Signaltransduktion humaner NK-Zellen, die unabhängig von ZAP70 und Syk erfolgt.¹²⁹ Bei Mäusen liegt NKG2D durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen (kurze Form, NKG2D-S und lange Form, NKG2D-L) vor, die sich in der Länge der zytoplasmatischen Domäne um 13

Aminosäuren unterscheiden.¹³¹ NKG2D-S assoziiert mit DAP10 und DAP12, NKG2D-L hingegen nur mit DAP10.

Selbst in Gegenwart inhibitorischer Signale kann NKG2D eine Aktivierung von Effektorfunktionen der Zellen induzieren.¹³² Jedoch sind naive NK-Zellen nicht in der Lage, allein durch Stimulation von NKG2D hinreichend zu antworten, sondern müssen durch einen weiteren Rezeptor wie z.B. 2B4 oder NKp46 kostimuliert werden.¹³³

2.4.2 NKG2D-Liganden (NKG2D-L)

Die humanen NKG2DL weisen eine MHC-Klasse-I-ähnliche Struktur auf, assoziieren aber weder mit Peptiden noch mit β 2-Mikroglobulin. Sie unterscheiden sich in ihrer Sequenz, Struktur und Affinität zu NKG2D¹³⁴ und können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die MIC ((MHC class I related chain)-Moleküle und die RAET1 (*Retinoic Acid Early inducible Transcript 1*)-Moleküle, auch ULBP (*UL16 binding protein*)-Moleküle genannt, da drei von diesen ursprünglich als Liganden des UL16-Proteins aus dem Cytomegalievirus charakterisiert wurden.¹³² Die beiden MHC-Klasse-I-ähnlichen Glykoproteine MICA und MICB wurden als erste Liganden für humanes NKG2D beschrieben¹³⁵ und sind in der MHC-Klasse-I-Region nahe des HLA-B-Lokus kodiert.¹³⁶ Sie bestehen aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne.¹³⁴ In Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass NKG2D mit der α 1/ α 2-Plattformdomäne seiner Liganden interagiert, analog zu der Interaktion von $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren und MHC-Klasse-I-Molekülen.^{118,137,138} Die ULBP-Moleküle (ULBP1-6) besitzen wie die MIC-Moleküle eine MHC-Klasse-I-ähnliche α 1/ α 2 Superdomäne, aber keine α 3 Domäne.^{78,131,141,142} Sie sind mit Ausnahme von ULBP4 und ULBP5 mittels eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers in der Zellmembran befestigt.^{132,134-136} ULBP2 kann auf der Zelloberfläche als Transmembranprotein oder GPI-verankertes Protein exprimiert werden.¹⁴³

NKG2DL der Maus sind neben den Mitgliedern der RAE-1 Familie (RAE1 α bis RAE1 ϵ), auch H60 und MULT1 (*murine UL16-binding protein-like transcript 1*).^{141,142,144} Diese sind ebenfalls MHC-Klasse I-ähnliche Moleküle, denen die α 3-Domäne fehlt. Eine Übersicht über die verschiedenen humanen und murinen NKG2D Liganden zeigt Tabelle 1. Die Diversität der NKG2DL stellt eine Besonderheit dar, wobei deren Zweck bislang weitgehend ungeklärt ist. Möglicherweise wurde die Vielfalt der Liganden durch evolutionären Selektionsdruck zum Vorteil für das Immunsystem. Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten (600nM bis 1,1 μ M)^{116,134,145} dienen potentiell einer Feineinstellung der NKG2D-vermittelten NK-Zell-Aktivierung. Zudem sind die NKG2DL auch polymorph. Für MICA wurden bereits über 80

Allele und für MICB über 30 Allele identifiziert.¹⁴⁶ Einige Allele unterscheiden sich bezüglich ihrer Bindungsaffinität zum Rezeptor.¹³⁹ Möglicherweise existieren auch weitere Rezeptoren für NKG2DL.¹⁴⁷

Die Expression von NKG2DL unterliegt nach bisherigem Kenntnisstand einer strikten Regulation, was in Einklang mit dem hohen Aktivierungspotential dieser Liganden für zytotoxische Lymphozyten steht.¹¹⁶ Sie wird durch zellulären Stress wie maligne Transformation, Infektion mit Pathogenen oder Hitzeschock induziert.^{134,148-152} Deshalb sind NKG2DL auf vielen Tumorzelllinien, primären Tumoren und virusinfizierten Geweben exprimiert.^{132,134,139,148,149,153,154} Humane Normalgewebe exprimieren im Allgemeinen keine NKG2DL auf der Zelloberfläche. Für MICA und MICB wurde beschrieben, dass sie in geringem Ausmaß konstitutiv auf gesunden gastrointestinalen Epithelzellen exprimiert werden, möglicherweise aufgrund der Interaktion dieser Zellen mit der benachbarten bakteriellen Flora.^{148,151} Nachfolgende Studien zeigten zudem, dass die meisten MICA-positiven epithelialen Zellen den Liganden intrazellulär exprimieren.¹⁵⁵ Eine funktionelle Relevanz bezüglich der NK-Zell-Reaktivität konnte nicht nachgewiesen werden.^{148,155} In unterschiedlichsten anderen Geweben wurden NKG2DL auf mRNA-Ebene,^{132,156,157} oder wie im Falle von bronchialem Epithel intrazellulär,¹⁵⁸ jedoch nicht auf der Zelloberfläche, detektiert.¹⁵⁹

Tabelle 1: Humane und murine NKG2DL.

GPI: Glykosylphosphatidylinositol; MIC: MHC class I chain-related protein; MULT1: murine UL16-binding protein like transcript 1; ND: not determined; NKG2DL: NKG2D Liganden; RAE1: retinoic acid early inducible 1; RAET1: retinoic acid early inducible transcript1; TM: Transmembrandomäne; ULBP: UL16-binding protein. Modifizierte Abbildung nach Raulet et al., 2013, Watzl et al., 2003; Mistry and O'Callaghan, 2007.

Ligand	Synonym	Plasmamembran-Verankerung	Bindungsaffinität, K_D
Humane NKG2DL			
MICA	PERB11.1	TM	$0,9-1 \times 10^{-6}$ M
MICB	PERB11.2	TM	$0,8 \times 10^{-6}$ M
ULBP1	RAET1I	GPI	$1,1 \times 10^{-6}$ M
ULBP2	RAET1H	GPI	ULBP2>ULBP1>ULBP3
ULBP3	RAET1N	GPI	
ULBP4	Raet1E	TM	
ULBP5	RAET1G	TM	ND
ULBP6	RAET1L	GPI	ND
Murine NKG2DL			
RAE-1 α	RAE-1a	GPI	7×10^{-7} M
RAE-1 β	RAE-1b	GPI	$3-19 \times 10^{-7}$ M
RAE-1 γ	RAE-1c	GPI	$5-6 \times 10^{-7}$ M
RAE-1 δ	RAE-1d	GPI	$7-8 \times 10^{-7}$ M
RAE-1 ϵ	RAE-1e	GPI	3×10^{-8} M
H60a		TM	$2-3 \times 10^{-8}$ M
H60b		TM	3×10^{-7} M
H60c		GPI	9×10^{-6} M
MULT1		TM	6×10^{-9} M

NKG2DL können auch auf Immunzellen exprimiert werden. So wurde gezeigt, dass auf DCs und Monozyten/Makrophagen durch Stimulation mit LPS, Poly (I:C) oder IFN- α eine NKG2DL-Expression induziert wird,¹⁶⁰⁻¹⁶⁴ die dann zur Aktivierung von NK- und T-Zellen beiträgt.^{162,164-168} Auch konnte eine NKG2DL-Expression (MICA und ULBP1-3) auf Antigen-aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert werden.¹⁶⁹⁻¹⁷² Die NKG2DL-Expression auf hämatopoetischen Zellen scheint von immunregulatorischer Bedeutung zu sein.¹⁶⁷ So wird z.B. davon ausgegangen, dass die Eliminierung aktivierter NKG2DL-exprimierender T-Zellen

durch NK-Zellen zur Termination der T-Zell-Immunantwort beiträgt.¹⁷³ Eine aberrante NKG2DL-Expression wird auch mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert.¹⁵¹ Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene kann die Expression von NKG2DL auch post-transkriptionell und post-translational reguliert werden.^{134,152} Hierfür konnten bereits verschiedene molekulare Signale und Mechanismen ausfindig gemacht werden. Die Expression von MICA und MICB wird z.B. unter bestimmten Bedingungen durch den *Heat Shock* Signalweg reguliert.¹⁴⁸ Interessanterweise konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass ULBP-Gene durch Hitzeschock reguliert werden.¹⁵² Es konnte weiterhin eine Verbindung zwischen dem *DNA-damage-pathway* und der Induktion von NKG2DL bei Mensch und Maus hergestellt werden. Die Arbeitsgruppe um Raulet zeigte, dass DNA-schädigende Agenzien die Expression von NKG2DL in Abhängigkeit der DNA-Sensoren ATM (Ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ATM- and Rad3-related) induzieren.¹⁵⁰ Dieser Mechanismus scheint für die tumor-assoziierte Expression von NKG2DL, sowie für die immunstimulierenden Effekte infolge von Zytostatikatherapie und Bestrahlung mitverantwortlich zu sein. Mehrere Publikationen berichten von der Regulation bestimmter NKG2DL durch microRNAs, welche nicht-kodierende RNAs sind, die an das 3'-Ende ihrer Zielgene binden und so die Translation verhindern oder mRNA Degradation induzieren.^{152,174-176} Die zellulären Prozesse, welche die microRNA-vermittelte Suppression der NKG2DL regulieren, sind noch unbekannt. Stern-Ginossar et al. postulierten, dass die microRNAs konstitutiv exprimiert sind und dazu dienen, die basale NKG2DL-Expression zu unterdrücken.¹⁷⁴ Die transkriptionelle Induktion der NKG2DL-Gene übertrifft dann gegebenenfalls diesen Pufferungseffekt und führt zur Oberflächenexpression von NKG2DL. Eine durch Immunstimuli induzierte Expression von mehreren microRNAs, die NKG2DL targeteten, weist jedoch auf eine regulatorische Rolle der microRNAs hin.¹⁷⁶ Epigenetische Mechanismen scheinen ebenso eine Rolle zu spielen, denn Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren wie Valproinsäure und auch demetylierende Agenzien wie 5'-Azacytidin induzieren eine erhöhte NKG2DL-Expression.¹⁷⁷⁻¹⁸⁴ Des Weiteren wird die NKG2DL-Expression z.B. auch durch all-trans Retinsäure (*all-trans retioic acid*, ATRA) und andere Differenzierung-induzierende Substanzen wie Trichostatin A (TSA), Vitamin D3, Bryostat-1 und den Proteasom-Inhibitor Bortezomib verstärkt.^{178,185} Verschiedene Studien belegten mittlerweile die Rolle des NKG2D/NKG2DL-Molekülsystems bei der Immunüberwachung von Tumoren.^{135,186-191} NKG2DL-transduzierte Tumorzelllinien, jedoch nicht die entsprechenden Parentalzelllinien, wurden nach subkutaner Inokulation durch NK-Zellen abgestoßen, und hierbei wird auch eine durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte spezifische Immunität erzeugt, die sich dann auch auf die Parentalzelllinien erstreckt.¹³¹ In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass NKG2D bei Methylcholantren induzierten Tumoren auch bei der Tumoringangition protektiv wirkt und einen wichtigen

Effektormechanismus bei der zytokinaktivierten Tumorelimination durch zytotoxische Zellen darstellt.¹⁰⁶ Zudem konnte mit NKG2D-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass NKG2D nicht für die NK-Zell-Entwicklung erforderlich, aber von kritischer Relevanz für die Immunüberwachung von Malignomen ist.^{189,191} Trotz der Expression von NKG2DL auf verschiedenen humanen Tumorzellen und deren hohem Aktivierungspotential für zytotoxische Lymphozyten^{131,186} können diese jedoch die Entwicklung klinisch aberranter Tumore nicht vollständig verhindern. Offensichtlich bestehen *immune escape*-Mechanismen, mit welchen Tumorzellen der NKG2D-vermittelten Immunüberwachung entkommen können. Ein weit verbreiteter Mechanismus, der die Interaktion von Immunsystem und Tumorzelle beeinflusst, stellt die lösliche Freisetzung von Tumorzell-exprimierten Oberflächenmolekülen dar.^{62,63,192} So konnte bereits 2002 gezeigt werden, dass Tumorzellen MICA in löslicher Form durch Metalloproteasen freisetzen.^{65,193} Nachfolgend wurden lösliche Formen der MIC-Moleküle^{153,194-199} und später auch der ULBP-Proteine in Seren von Patienten verschiedenster solider Krebs-Entitäten^{134,200} und auch von Patienten mit malignen hämatopoetischen Erkrankungen^{153,180,196,201-204} in erhöhten Konzentrationen gefunden. Eine Vielzahl von Arbeiten belegte die Rolle der löslichen Freisetzung verschiedener NKG2DL für den *escape* von Tumorzellen vor der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung.^{152,200} Inzwischen wurde gezeigt, dass die löslichen Formen der NKG2DL durch vier Mechanismen freigesetzt werden können: proteolytisches *Shedding*, PI-PLC (*Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C*)-vermitteltes *Cleavage*, alternatives Splicing oder in Vesikeln als Exosomen.^{65,193,199,205-211}

Die Freisetzung - durch *Shedding* und *Cleavage* - setzt die Oberflächendichte der Liganden auf den Tumorzellen herab und wirkt so der NKG2D-vermittelten Tumorummunabwehr entgegen. Eine weitere mögliche Konsequenz stellt die Interaktion der freien Liganden mit NKG2D auf der Zelloberfläche von Immunzellen dar. So konnte gezeigt werden, dass lösliche NKG2DL zu einer systemischen Herunterregulation von NKG2D auf NK- und T-Zellen führen, welche mit einer funktionellen Beeinträchtigung der Effektorfunktionen dieser Zellen einhergeht.^{65,212-214} Mehrere Studien berichten von einer reduzierten NKG2D-Expression auf zytotoxischen Lymphozyten von Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden.^{134,200} Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von löslichem MICA im Serum von Patienten mit epithelialen Tumoren und der Herabregulation von NKG2D auf CD8⁺-T-Zellen gezeigt werden.⁶⁵ In anderen Studien konnte keine Herunterregulation des NKG2D-Rezeptors in Gegenwart löslicher NKG2DL beobachtet werden, so dass Uneinigkeit darüber besteht, ob lösliche NKG2DL die reduzierte NKG2D-Expression in Krebspatienten (mit)verursachen oder/und andere Serumfaktoren wie z.B. TGF- β oder L-Kynurenin dafür verantwortlich sind.^{123,124,127,134,216,217} Darüberhinaus konnte

kürzlich die Arbeitsgruppe von Raulet zeigen, dass lösliches MULT1, ein NKG2DL der Maus, NK-Zellen aktivierte und reduzierte dadurch die Tumorzellvolumina in Mäusen.²⁸⁵ Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien könnte auf der unterschiedlichen Beschaffenheit der freigesetzten löslichen Liganden beruhen. Im Gegensatz zu monovalenten Liganden wird für multivalente Liganden - wie sie in Exosomen zu finden sind – postuliert, dass sie Rezeptoren vernetzen und so Signale, die für eine Herunterregulation des Rezeptors benötigt werden, vermitteln.²¹⁸ Auch die konstitutive Expression von membranständigen NKG2DL scheint die Funktion von NKG2D in Mensch und Maus zu beeinträchtigen. Tumor-residente NK- und T-Zellen zeigen eine herabgesetzte NKG2D-Expression und IFN- γ -Produktion, wenn der Tumor NKG2DL exprimiert.^{65,208,219,220}

Während die Relevanz des NKG2D/NKG2DL-Systems bei der NK-Zell vermittelten Immunüberwachung epithelialer Tumore eindeutig belegt war, war dessen Rolle bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen bislang umstritten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem die Expression und der Einfluss von NKG2DL in membranständiger und löslicher Form auf die Immunüberwachung von Leukämiezellen durch NK-Zellen untersucht.

2.5 Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und binden – in monomerer Form – spezifisch an das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) von Immunglobulinen und ermöglichen so eine Verknüpfung von humoralen und zellulären Komponenten des Immunsystems. Ihre Klassifizierung ergibt sich aus der jeweiligen Spezifität für die Antikörperklasse: so werden z.B. die Rezeptoren für IgA, IgG und IgE als Fc α R, Fc γ R und Fc ϵ R bezeichnet.

Die Fc γ -Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16), und für Fc γ RII und Fc γ RIII lassen sich zudem weitere Subtypen unterscheiden. Neben der gewebespezifischen Expression der Fc γ -Rezeptormoleküle trägt auch das durch Ligandenbindung und Kreuzvernetzung der Rezeptormoleküle induzierte Signaling durch die unterschiedlichen zytoplasmatischen Domänen zu der großen funktionellen Heterogenität der Fc γ -Rezeptoren bei.²²¹ Im Gegensatz zum Fc γ RII und Fc γ RIII, die eine niedrige Ligandenaffinität aufweisen und über nur zwei immunglobulin-ähnliche Domänen verfügen, weist der hochaffine Fc γ RI drei dieser Domänen auf und ist so in der Lage, auch monomeres (einkettiges) IgG zu binden. Die Bindung des Fc-Fragments eines Antikörpers an den Fc γ -Rezeptor wird modellhaft folgendermaßen beschrieben: Zunächst bindet eine der beiden Fc-Ketten des Antikörpers – im Bereich seiner unteren *hinge region*

und der c_{H2} -Domäne – an die D2-Domäne des $Fc\gamma R$, anschließend die zweite Fc-Kette mit den gleichen Regionen an andere Bereiche des $Fc\gamma R$.^{222,223} Die höhere Affinität des $Fc\gamma RI$ wird auf die zusätzliche Bindung der dritten extrazellulären Domäne an den Antikörper zurückgeführt.²²⁴ Die unterschiedliche Affinität der $Fc\gamma$ -Rezeptoren zu den verschiedenen IgG-Klassen (IgG1-IgG4) ist vor allem auf deren unterschiedliche Strukturen in der *hinge region* und der c_{H2} -Domäne zurückzuführen.²²⁵ Die Signalübertragung nach Ligandenbindung durch Fc-Rezeptoren resultiert hauptsächlich aus der Kreuzvernetzung (*cross linking*) aktivierter Rezeptormoleküle. Dabei müssen sich mehrere Rezeptor-Liganden-Komplexe in räumlicher Nähe befinden, so dass sich auch die Signale der ITAM's bzw. ITIM's ihrer zytoplasmatischen Domänen bzw. ihrer assoziierten Adaptormoleküle verschalten können.²²⁶ Da freie, nicht an Antigene gebundene, Antikörper nach einer Bindung an vereinzelte Fc-Rezeptoren so keine aktivierenden Signale induzieren können, wird auf diese Weise die Spezifität der vermittelten Immunantwort gesichert.

Die aktivierenden Moleküle $Fc\gamma RI$ und $Fc\gamma RIa$ werden vor allem von Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert und lösen vor allem Phagozytose und *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) aus. Der $Fc\gamma RIb$ wird dagegen von allen Immunzellen – außer NK-Zellen und T-Zellen – exprimiert und besitzt eher eine regulatorische Funktion, da er in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITIM aufweist und so inhibitorische Signale vermittelt.²²²

Der $Fc\gamma RIb$ wird von Granulozyten exprimiert und dient vor allem als *decoy receptor*, da er – im Gegensatz zu den anderen $Fc\gamma$ -Rezeptormolekülen – keine transmembrane und zytoplasmatische Domäne besitzt und nur über Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert ist.²²⁷

Der $Fc\gamma RIa$ (CD16) wird vor allem von NK-Zellen und Monozyten exprimiert, hat eine hohe Spezifität für IgG1 und IgG3, bindet diese aber mit niedriger Affinität. Er bildet einen multimeren Rezeptorkomplex aus der ligandenbindenden α -Kette und einem Dimer zur Signaltransduktion (Homo- oder Heterodimere aus CD3 ζ - und $Fc\epsilon RI\gamma$ -Ketten)²²⁸ und löst bei Kreuzvernetzung ADCC und Zytokinproduktion bei NK-Zellen aus.^{228,229}

Für den $Fc\gamma RIa$ wurden verschiedene Polymorphismen beschrieben. An Position 48 der Aminosäuresequenz existieren drei verschiedene Allele, die für Leucin (L), Arginin (R) oder Histidin (H) kodieren (Allelfrequenzen: 86%, 6% und 8%). An Position 158 konnte ein weiterer Polymorphismus festgestellt werden, der für Phenylalanin (F) oder Valin (V) kodiert (Allelfrequenzen: 57% und 43%). Während für den Polymorphismus an Position 48 letztlich keine Effekte nachgewiesen werden konnten, zeigte die 158V-Variante eine deutlich verstärkte Bindung von IgG1 und IgG3.^{230,231} Der Polymorphismus an Position 158 scheint

durchaus auch von klinischer Relevanz: Bei Patienten mit der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematodes (SLE) konnte eine erhöhte Frequenz des niedrig-affinen 158FF-Genotyps nachgewiesen werden.²³² Bei der Therapie des Follikulären Non-Hodgkin-Lymphoms mit dem CD20-Antikörper Rituximab konnte bei Patienten mit 158VV-Genotyp ein verbesserteres Ansprechen und eine erhöhte Tumoreradikation beobachtet werden als bei heterozygoten Patienten mit 158FV-Genotyp oder homozygoten Patienten mit 158FF-Genotyp.²³³

Auch wenn monoklonale Antikörper (mAb) in der Anti-Tumor-Therapie bereits erfolgreich eingesetzt werden, sind sie in ihrer Wirksamkeit – besonders bei schwach-exprimierten Antigenen – limitiert und führen nicht in allen Fällen zu befriedigenden Therapieergebnissen. Durch Modifikation der Fc-Fragmente von Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Affinität des Fc-Teils zum Fc-Rezeptor mit der induzierten Zytotoxizität gegen Zielzellen korreliert.^{234,235} Diese Daten suggerieren, dass Fc-optimierte Antikörper auch bei der Tumorthherapie zu besseren Ergebnissen führen könnten.²³⁶ Optimale Therapieergebnisse sind dabei von einem Antikörper zu erwarten, der eine gesteigerte Affinität und Spezifität für aktivierende Fc-Rezeptoren, gleichzeitig aber eine geringere Affinität zum inhibitorischen Fc γ RIIb aufweist. Mit der S239D/I332E-Modifikation konnte eine solche Modifikation gefunden werden.²³⁷ Im Vergleich zu Antikörpern mit einem *wild type* Fc-Teil konnte eine deutlich erhöhte Affinität des Fc γ RIIIa für Antikörper mit dieser Modifikation nachgewiesen werden (bis zu 254-fache Verstärkung). Diese war interessanterweise sowohl bei Fc γ RIIIa-Molekülen mit 158V- als auch mit 158F-Polymorphismus zu beobachten. In den Analysen wurde auch eine stärkere Bindung an den inhibitorischen Rezeptor Fc γ RIIb festgestellt, allerdings konnte für die Affinität des modifizierten Fc-Teils zu den Rezeptoren (Fc γ RIIIa : Fc γ RIIb) eine Ratio von 4:1 nachgewiesen werden.²³⁷ Im Vergleich zu Antikörpern mit einem *wild type* Fc-Teil führt die S239D/I332E-Modifikation eines Antikörpers demnach zu einer verstärkten Bindung an Fc-Rezeptoren, bietet aber den Vorteil einer relativen Selektivität zum aktivierenden Fc γ RIIIa.

In der vorliegenden Arbeit sollte u.a. das Potential eines Fc-optimierten NKG2D-Fc Fusionsproteins (NKG2D-Fc-ADCC) – im Vergleich zu Proteinen mit *wild type* Fc-Teil (NKG2D-Fc-WT) oder *knockout* Fc-Teil (NKG2D-Fc-KO) – zur Aktivierung der NK-Zell-Reaktivität untersucht werden.

2.6 Leukämien

Der Begriff Leukämie („weißes Blut“) wurde von Rudolf Virchow geprägt, der 1845 nahezu zeitgleich mit John Hughes Bennett und Alfred Donné das Krankheitsbild einer Leukämie

beschrieb und sich dabei auf die verbreiterte, weiße Leukozytenmanschette („*buffy coat*“ auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation des Blutes) bei Leukämiepatienten mit hohen Leukozytenzahlen bezog. Leukämien sind definiert als maligne Neoplasien hämatopoetischer Zellen. 1900 führte Otto Naegeli die Einteilung der Leukämien in myeloische und lymphatische, d.h. nach der Zellreihe, von welcher die jeweiligen Leukämiezellen abstammen, ein. Eine weitere Einteilung erfolgte anhand des Krankheitsverlaufs in akute und chronische Leukämien.

2.6.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Akute myeloische Leukämien (AML) sind Neoplasien der Myelopoese und durch eine große Anzahl aberranter myeloischer Zellen charakterisiert. Die Entstehung der AML ist ein mehrstufiger Prozess, der zunächst auf einer klonalen Expansion einer kleinen Anzahl transformierter, hochproliferativer leukämischer Stammzellen beruht. Neben ihrer monoklonalen Expansion unterscheiden diese sich von normalen myeloischen Zellen dadurch, dass sie nur in Ausnahmefällen zu funktionellen Monozyten und Granulozyten ausreifen.²³⁹ Folglich kommt es zu einer Akkumulation von reifungsgestörten leukämischen Zellen im Knochenmark, was zu einer zunehmenden Verdrängung der normalen Hämatopoese führt.²⁴⁰ Es resultiert eine Knochenmarkinsuffizienz, welche mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie einhergeht. Zudem kommt es zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen in das periphere Blut und möglicherweise auch zu einem Übergreifen auf extramedulläre Organe und so letztlich zu entsprechenden klinischen Folgeerscheinungen.²⁴¹ Die akute myeloische Leukämie umfasst ca. 80% der akuten Leukämien der Erwachsenen. Mit steigendem Lebensalter nimmt die Inzidenz dieser Erkrankung zu.²⁴² Neben einer Leukozytose, die deutlich über 100.000 Leukozyten pro μl betragen kann, zeigt ein Teil der Patienten normale oder sogar erniedrigte Leukozytenwerte mit unter 5.000 Leukozyten pro μl .

Für die Diagnostik ist zunächst im Besonderen die Differenzierung der AML gegenüber der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) essentiell. Der wichtigste Schritt bei der Primärdiagnostik einer AML ist die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellpopulationen im Knochenmark, ergänzt durch die Auswertung des Blutausstrichs. Gemäß WHO-Klassifikation (siehe unten) ist die Diagnose einer AML zu stellen, wenn der Blastenanteil im Knochenmark oder peripheren Blut mindestens 20% beträgt. Die Diagnose einer AML ist unabhängig vom Anteil der Knochenmarkblasten auch dann zu stellen, wenn im Rahmen der zyto- bzw. molekulargenetischen Analytik bestimmte chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden.²⁴¹ Die weitere Diagnostik beruht auf der Klassifikation mittels ätiologischer,

morphologischer, zytochemischer, immunologischer sowie zyto- und/oder molekulargenetischer Merkmale. Die akuten myeloischen Leukämien werden traditionell aufgrund morphologischer und zytochemischer Kriterien der French-American-British (FAB) Cooperative Group morphologisch klassifiziert und in sieben Subtypen eingeteilt (Tabelle 3).²⁴³

Tabelle 2: French-American-British- (FAB-) Klassifikation der AML.

FAB-Typ	Differenzierungsstadium
M0	undifferenzierte Leukämie
M1	Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung
M2	Myeloblastenleukämie mit Ausreifung
M3	Promyelozytenleukämie
M3v	Variante der Promyelozytenleukämie
M4	Myelomonozytäre Leukämie
M4eo	Myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen
M5	Monoblastenleukämie
M6	Erythroblastenleukämie
M7	Megakaryoblastenleukämie

Zur Primärdiagnostik einer akuten Leukämie gehört des Weiteren routinemäßig die Immunphänotypisierung mittels spezifischer Fluorochrom-markierter Antikörper und der Durchflusszytometrie. Immunzytologisch werden die myeloischen Blasten gemäß den EGIL (*European Group for the Immunological Charakterization of Leukemias*)-Kriterien durch eine gleichzeitige Expression von zwei oder mehr myelomonozytären Markern (MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117) definiert. Der immunologische Subtyp wird über weitere Oberflächenmarker zugeordnet (Tabelle 4). CD64 und CD14 charakterisieren die monozytäre Reihe. CD15, CD16 und LF die granulozytäre Reihe. Die erythroide Reihe wird durch CD71 und Glykophorin A repräsentiert, die thrombozytäre durch CD41 und CD61. Reifegradassoziierte Antigene sind CD34, HLA-DR und CD117. Der frühe Differenzierungsweg spiegelt sich im Antigenprofil der leukämischen Blasten wieder. Chromosomale Aberrationen werden mittels zytogenetischer Untersuchungsmethoden nachgewiesen und legen weitere diagnostisch und prognostisch relevante Entitäten fest. Einzelne chromosomale Aberrationen können bei mehreren FAB-Subtypen vorkommen und eine aberrante Expression immunologischer Marker bei verschiedenen zytogenetischen Befunden gefunden werden. Die Expression von z. B. CD19 bei einer AML kann sowohl mit ungünstigen ((t9;22) und 11q23-Rearrangement) als auch günstigeren ((t8;21) und t(15;17))

prognostischen Faktoren assoziiert sein. Bestimmte Anomalien im Karyotyp sind dabei häufig mit spezifischen klinischen und morphologischen Subtypen der AML assoziiert. So wird z.B. die Translokation t(15;17) bei fast allen Leukämien des FAB-Typs M3 oder M3v nachgewiesen.

Tabelle 3: Antigenexpression bei der akuten myeloischen Leukämie.

+: immer positiv; -: immer negativ; +/-: in mehr als 50% der Patienten positiv;

-/+ : in weniger als 50% der Patienten positiv.

Antigen	M0	M1/M2	M3	M4,M5	M6	M7
MPO	+/-	+	+	-/+	+	-
CD11b		-/+		+		
CD13	+/-	+	+	+/-	-/+	+/-
CD14	-	-	-	+/-		-
CD15	-	+/-	-/+	+/-		-
CD33	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
CD34	+/-	+/-	+/-	-/+	+	
CD36	-	-	-	+	+	-
CD61	-	-	-		-	+
CD64	-	-	+/-	+		
CDw65	-/+	+/-	-/+	+/-		+/-
CD71					+	
CD117	+/-	+/-	-/+	-/+		
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	-/+
Gly A	-	-	-	-	+	-

Gegenwärtig erfolgt die Einteilung der AML entsprechend der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2001, welche 2008 aktualisiert wurde. Diese stellt eine Kombination aus den klassischen zytomorphologischen und zytochemischen Methoden, der Immunphänotypisierung und der Zyto- und Molekulargenetik mit weiteren klinischen Faktoren dar. In dieser Systematik existieren weiter die von der FAB-Klassifikation festgelegten morphologischen und immunologischen Kriterien zur Begrenzung einzelner Subtypen. Darüber hinaus werden AML mit rekurrenten genetischen Abnormalitäten, therapieassoziierte AML und AML mit multilineärer Dysplasie in eigenen Gruppen zusammengefasst (Tabelle 5). Die Grenze zwischen MDS (Myelodysplastisches Syndrom) und AML wurde ebenfalls von bisher 30% Knochenmarkblasten (FAB) auf aktuell 20% herabgesetzt.

Die AML-Therapie gliedert sich in die Induktionstherapie mit dem primären Ziel des Erreichens einer sogenannten kompletten Remission (CR) und die Postremissionstherapie zur Erhaltung der CR. Unter einer kompletten Remission wird die morphologische Eradikation des malignen Klon sowie eine Erholung des peripheren Blutbildes verstanden. Diese wurden erst nach Einführung von Daunomycin und Cytarabin erreicht.²⁴⁴⁻²⁴⁶ Die Art der hierfür verwendeten Therapie ist derzeit Inhalt zahlreicher klinischer Studien. Die Standard-Induktionstherapie ist die Kombination aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins (Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron) und sieben Tage des Zytostatikums Cytarabin (3+7 Schema). Sprechen Patienten nicht auf eine oder gar zwei Induktionstherapiezyklen an, gelten sie als primär refraktär und werden mit einer Salvage-Chemotherapie weiterbehandelt. Bei der akuten Promyelozytenleukämie wird routinemäßig All-trans-Retinolsäure (ATRA) verabreicht. Als Konsolidierungstherapie oder Erhaltungstherapie werden unterschiedliche Strategien eingesetzt. Die Wahl ist abhängig vom Typ und Risikoprofil der vorliegenden AML, vom Vorhandensein eines passenden Familien- oder Fremdspenders und von Patientenfaktoren wie Alter und Allgemeinzustand. Die Konsolidierungstherapie kann z. B. mit hochdosiertem Cytarabin oder einer autologen oder allogenen Stammzelltransplantation erfolgen. Je höher das Rezidivrisiko und je besser der Allgemeinzustand des Patienten, desto eher wird man sich bei Vorliegen eines geeigneten Spenders für die allogene Transplantation entscheiden. Bemühungen eine erfolgreiche Antikörpertherapie der AML zu etablieren, sind bisher noch erfolglos.

Tabelle 4: WHO-Klassifikation der AML.

Kategorie	Leukämieformen
AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22); AML1/ETO
	AML mit abnormen Knochenmarkeosinophilen und inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBF β /MYH11
	Akute Promyelozytenleukämie - AML M3 mit t(15;17)(q22;q12); PML/RARa - und Varianten
	AML mit 11q23-(MLL-)Anomalien
	AML mit t(9;11)(p22;q23), <i>MLLT3-MLL</i> oder anderen 11q23 (<i>MLL</i>) Abnormalitäten
	AML mit t(6;9)(p23;q34), <i>DEK-NUP214</i>
	AML mit inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2), <i>RPN1-EVI1</i>
Therapieinduzierte AML	AML (megakaryoblastic) mit t(1;22)(p13;q13), <i>RBM15-MKL1</i>
	Provisorische Entitäten: AML mit mutiertem NPM1 AML mit mutiertem CEBPA
	AML nach Gabe von Alkylanzien AML nach Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren AML nach sonstiger Chemo-/ Strahlentherapie
AML mit multilineärer Dysplasie	AML mit vorausgegangener Myelodysplasie/myeloproliferativem Syndrom
	De-novo-AML ohne vorausgegangenes Syndrom
AML nicht anderweitig klassifizierbar	AML, undifferenziert (FAB M0)
	AML ohne Ausreifung (FAB M1)
	AML mit Ausreifung (FAB M2)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
	Akute monoblastische und monozytäre Leukämie (FAB M5a, b)
	Akute Erythroleukämie (FAB M6)
	Akute Megakaryoblasten-Leukämie (FAB M7)
Akute Basophilen-Leukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose	
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	Transient abnormale Myelopoesen
	Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	

2.6.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Bei Erwachsenen machen die akuten lymphatischen Leukämien weniger als 15% aller akuten Leukämien aus. Der absolute Häufigkeitsgipfel liegt im Kindesalter unter fünf Jahren und erreicht einen zweiten Gipfel im Alter über 80 Jahren. ALL gehen von maligne entarteten lymphatischen Vorläuferzellen aus, wobei die Entartung auf verschiedenen Ebenen der lymphatischen Zellreifung stattfinden kann. Nachfolgend kommt es in der Regel zu einer fortschreitenden Knochenmarkinsuffizienz mit Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Etwa 75% aller ALL-Fälle im Erwachsenenalter lassen sich der B-lymphozytären Reihe (B-ALL) zuordnen und etwa 25% der T-Zellreihe (T-ALL). Gemäß den Kriterien der EGIL-Klassifikation liegt eine B-ALL vor, wenn mindestens zwei der drei Marker CD19, CD22 und CD79a exprimiert werden. Weiterhin teilt man die ALL entsprechend der Reifestufe in vier Subtypen (Pro-B-ALL, Common-ALL, Prä-B-ALL, reife B-ALL) ein (Tabelle 6). Mehr als 60% der erwachsenen ALL-Patienten zeigen zytogenetische Aberrationen, die häufig charakteristisch für bestimmte phänotypische und klinische Ausprägungen sind und teilweise auch prognostische Bedeutung haben. Die Pro-B-ALL assoziiert in 25% mit der prognostisch ungünstigen Translokation t(4;11)(q21;q23), und häufig wird eine Koexpression myeloischer Antigene (vor allem CD15, aber auch CD13, CD33 und CDw65) beobachtet. Die Koexpression myeloischer Antigene kommt außerdem häufig bei der ebenso prognostisch ungünstigen t(9;22)(q34;q11) Translokation vor. Bei ca. 25% aller Prä-B-ALL korreliert der Phänotyp CD19+, CD10+ CD34-, CD9+ mit der t(1;19)(q23;p13) Translokation. In den meisten Fällen von reifer B-ALL treten die Translokationen t(8;14)(q24;p32), t(2;8)(q12;q32) oder t(8;22)(q24;p11) auf.

Tabelle 5: Antigenexpression bei der B-ALL. clgM: zytoplasmatische IgM-Schwerketten; clg, zytoplasmatische, slg, oberflächliche Leichtketten.

Subtyp	Antigene
Pro-B-ALL	Keine Differenzierungsantigene
Common-B-ALL	CD10+, clgM-, slg-
Prä-B-ALL	clgM+, slg-, Fehlen der zytoplasmatischen Leichtketten
Reife B-ALL	slg+ (κ + oder λ +)

Die T-ALL wird durch die Expression von CD3 definiert und weist oft den Verlust typischer T-Linien-Marker und die Expression aberranter Phänotypen auf. Die EGIL-Klassifikation teilt auch die T-ALL in vier Subtypen ein (Tabelle 7). Die meisten T-ALL sind TdT positiv und HLA-DR sowie CD34 negativ.

Zur Behandlung der ALL der Erwachsenen werden verschiedene Chemotherapie-Verfahren und zum Teil auch Strahlentherapie eingesetzt. Standard für die Induktionstherapie sind Vincristin und Dexamethason in Kombination mit einem Anthrazyklin-Derivat (meistens Dauno/Doxorubicin). Zusätzlich werden Asparaginase, CD20-Antikörper bei CD20-positiver ALL und in Fällen von Philadelphia-Chromosom-positiver ALL Wirkstoffe wie Imatinib, Nilotinib und Dasatinib (siehe CML) eingesetzt. Europäische Empfehlungen zur Therapie der ALL wurden von der European Working Group for Adult ALL erstellt. Die Durchführung einer intensiven Konsolidationstherapie ist dabei Standard. Hierfür bestehen sehr unterschiedliche Konzepte. Die allogene Stammzelltransplantation ist ein wesentlicher Bestandteil der Postremissionstherapie.

Tabelle 6: Antigenexpression bei der B-ALL. cIgM: zytoplasmatische IgM-Schwerketten; sIg:zytoplasmatische oder oberflächliche Leichtketten

Subtyp	Antigene
Pro-T-ALL	CD7+
Prä-B-ALL	CD2+ und/oder CD5+ und/oder CD8+
Kortikale T-ALL	CD1a+
Reife T-ALL	CD3+, CD1a-

2.6.3 Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die chronische myeloische Leukämie geht mit einer starken Vermehrung speziell von Granulozyten und ihren Vorstufen im Blut und Knochenmark einher. Sie kommt in allen Altersgruppen vor, weist allerdings eine stetige Zunahme mit zunehmendem Alter auf und wird im Mittel mit 55-60 Jahren diagnostiziert. In fast allen Fällen (ca. 90%) findet man zytogenetisch ein atypisches, verkürztes Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom. Dieses entsteht als Ursache einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)(q34;q11)). Diese Translokation bedingt die *BCR-ABL* (*Breakpoint Cluster Region-Abelson-Tyrosinkinase*)-Genfusion auf dem veränderten Chromosom 22 und *ABL-BCR* auf dem veränderten Chromosom 9. Das *ABL*-Gen kodiert für eine Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der zellulären Wachstumsregulation einnimmt. Das Onkogen *BCR-ABL* führt zur dauerhaft aktiven Tyrosinkinase-Aktivität und so zu einer gesteigerten und unkontrollierten Vermehrung der betroffenen Zellen. Die CML wird klassischerweise in drei Krankheitsphasen, die chronische Phase, die Akzelerationsphase und die Blastenkrise oder Blastenschub, unterteilt. Die Erkrankung wird meistens in der chronischen Phase diagnostiziert. Die Diagnosestellung umfasst zunächst eine Knochenmark-Zytologie. Charakteristisch für die CML ist eine Steigerung der

Megakaryopoese, Myelopoese und auch Erythropoese. Die Myelopoese ist dabei am stärksten gesteigert und gewinnt in der Spätphase der Erkrankung auf Kosten der anderen Zellreihen die Oberhand. In der chronischen Phase finden sich, im Gegensatz zur akuten myeloischen Leukämie, trotz stark erhöhter Leukozytenzahlen nur wenige Blasten. Bei der CML können Leukozytenzahlen bis zu über 500.000/ μ l erreicht werden. Zudem zeigen die CML-Zellen eine Tendenz zur Adhäsion und folglich die akute Gefahr von Leukostase-Symptomen. Die Kriterien der akzelerierten Phase und der Blastenkrise sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Kriterien der akzelerierten Phase und Blastenkrise der CML.²⁴⁷

Phase	Kriterien
Akzelerierte Phase	15-29% Blasten in Blut oder Knochenmark oder 30% Blasten und >30% Promyelozyten in Blut oder Knochenmark oder ≥20% Basophile in Blut oder Knochenmark oder Therapie-unabhängige Thrombozytopenie (<100.000/ μ l) oder Neu entstandene klonale Evolution oder Progrediente Fibrose des Knochenmark oder Progrediente Splenomegalie und ansteigende Leukozyten, die auf Therapie nicht ansprechen
Blastenkrise	≥30% Blasten in Blut oder Knochenmark oder Nachweis von extramedullären Blasten

Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts wurden zur Therapie neben der allogenen Stammzelltransplantation vor allem Interferon und Hydroxyharnstoff eingesetzt. Die Einführung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib revolutionierte die Behandlung der CML und verbesserte das Überleben der Patienten erheblich.²⁴⁸ Heute stehen in Europa die drei Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Imatinib, Nilotinib und Dasatinib für den Erstlinieneinsatz zur Verfügung, wobei Imatinib, ein TKI der ersten Generation, noch immer den Standard für die Erstlinientherapie aller CML-Patienten in der chronischen Phase darstellt. Die Überlegenheit von Imatinib gegenüber Interferon wurde in einer großen internationalen Phase-III-Therapiestudie mit mehr als 1000 CML-Patienten, der sogenannten IRIS-Studie, deutlich. So erreichte Imatinib ein besseres zytogenetisches Ansprechen und häufiger komplette zytogenetische Remissionen sowie molekulare Remissionen. Insgesamt wurde die Imatinib-Behandlung auch besser vertragen.

Trotz der Behandlungserfolge mit Imatinib benötigen etwa 20 bis 25% der CML-Patienten innerhalb von 5 bis 8 Jahren aufgrund ungenügender Wirksamkeit, einem Wirkungsverlust

oder einer Unverträglichkeit von Imatinib eine alternative Therapie.²⁴⁹ Therapieoptionen sind ein Wechsel zu einem anderen Tyrosinkinase-Inhibitor und eine allogene Stammzelltransplantation. Zwei Tyrosinkinase-Hemmstoffe der zweiten Generation, Nilotinib und Dasatinib, zeigten in der Erstlinientherapie bessere Effektivität mit höheren Raten zytogenetischer und molekularer Remissionen sowie eine Reduktion früher Akzelerationsphasen oder Blastenkrise im Vergleich zu Imatinib. Auch Imatinib-abhängige Nebenwirkungen wurden bei den Zweitgenerationsinhibitoren seltener beobachtet. Dies führte zur Erstlinienzulassung dieser beiden TKI für die Therapie der CML. Weitere neuere TKI sind Bosutinib und das T315I-aktive Ponatinib. Die Wahl der TKI für eine Zweitlinientherapie erfolgt nach klinischen Kriterien in Bezug auf das Nebenwirkungsspektrum, nach zytogenetischem und molekularem Ansprechen sowie nach dem Mutationsstatus bei Resistenz auf die Primärtherapie. Für die Wahl der Therapie bei CML in fortgeschrittener Phase muss berücksichtigt werden, ob die Progression eine Imatinib-Resistenz darstellt oder ob der Patient in Akzelerationsphase oder Blastenkrise TKI naiv ist.

2.6.4 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL stellt mit einer Inzidenz von ungefähr 3/100000 Einwohner pro Jahr in der westlichen Welt die häufigste leukämische Erkrankung (ca. ein Drittel) der Erwachsenen dar. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 65 bis 68 Jahre. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen.²⁵⁰ Die CLL ist charakterisiert durch eine klonale Vermehrung morphologisch reif erscheinender, aber funktionseingeschränkter oder funktionsloser Lymphozyten, die im Knochenmark, den Lymphknoten, der Milz und auch dem peripheren Blut akkumulieren. Ihre Vermehrung beruht nicht auf verstärkter Zellteilung – die meisten Zellen befinden sich in der G1/G0-Phase des Zellzyklus – sondern auf der Inhibition der Apoptose in diesen Zellen, wodurch sie eine deutlich verlängerte Lebenszeit aufweisen. Diese malignen Zellen sind in 95% der Fälle der B-Zell-Reihe (B-CLL) und nur selten der T-Zell-Reihe zuzuordnen. Nach der WHO-Klassifikation ist die CLL immer eine B-Zell-Neoplasie und die frühere T-CLL heißt heute T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL). In frühen Stadien verläuft die CLL meist asymptomatisch, daher erfolgt die Erstdiagnose der Erkrankung oftmals zufällig im Rahmen einer Blutbilduntersuchung durch den Nachweis einer Leukozytose. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es durch die fortschreitende Anzahl immuninkompetenter, entarteter B-Zellen zu einer zunehmenden Immunsuffizienz. Es kann zu Lymphadenopathien, Thrombozytopenien und erniedrigten Hämoglobin-Konzentrationen kommen, die durch Spleno- und Hepatomegalien weiter

verstärkt werden können. Die geltenden Richtlinien lassen eine Diagnose bei per Durchflusszytometrie gesicherter Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, D20, CD23 und CD5 ab einer Lymphozytenanzahl von 5000/ μ l im peripheren Blut zu. CD20 wird oft schwach und CD79b meist gar nicht exprimiert. Expression von CD10, CD22 und FCM7 fehlt komplett. Charakteristisch für die B-CLL ist eine hohe Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2. Da bei über 80% der CLL-Patienten chromosomale Aberrationen detektiert werden, die zum Teil auch von prognostischer Bedeutung sind, scheinen genetische Veränderungen in der Pathogenese der CLL eine Rolle zu spielen. Am häufigsten ist die Deletion del(13q14.1), ebenso kommen gehäuft die Deletionen del(11q22-23), del(6q21), del(17p13) oder Trisomien von Chromosom 12 vor. CLL-Patienten mit einem normalen Karyotyp haben die beste Prognose. Die klinische Klassifizierung erfolgt anhand der Stadieneinteilung von Rai beziehungsweise von Binet (Tabelle 8 und 9). Diese basieren wesentlich auf der Lymphozytenzahl im peripheren Blut bzw. der Erfassung infiltrierter Lymphknotenregionen. Zusätzlich sind für beide Einteilungen der Hämoglobinwert und die Thrombozytenzahl bedeutsam.

Tabelle 8: Stadieneinteilung der CLL nach Rai (1975).

Stadiu	Risiko	Definition	Überlebenszei
0	Niedriges Risiko	Nur absolute Lymphozytose ($> 15.000/\mu$ l Lymphozyten im peripheren Blut und $> 40\%$ Lymphozyten im Knochemark)	> 10 Jahre
I	Intermediäres Risiko	Lymphozytose und Lymphknotenvergrößerung	7 Jahre
II		Lymphozytose und Hepato- und/oder Splenomegalie (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung)	
III	Hochrisiko	Lymphozytose und Anämie mit Hb $< 11\text{g/dl}$ (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung und /oder Organomegalie)	< 3 Jahre
IV		Lymphozytose und Thrombozytopenie ($< 100.000/\mu$ l) (mit/ohne Anämie, Lymphknotenvergrößerung, Organomegalie)	

Tabelle 9: Stadieneinteilung der CLL nach Binet.

Stadium	Merkmale	Überlebenszeit
A	< 3 befallene Lymphknotenregionen (Lymphknoten, Leber oder Milz) Hb \geq 10g/dl Thrombozyten \geq 100.000/ μ l	> 10 Jahre
B	\geq 3 befallene Lymphknotenregionen (Lymphknoten, Leber oder Milz) Hb \geq 10g/dl Thrombozyten \geq 100.000/ μ l	5-7 Jahre
III IV	Befall der Lymphknotenregionen irrelevant Hb < 10g/dl und/oder Thrombozyten < 100.00/ μ l	2- 3 Jahre

Beide Einteilungen weisen Schwächen bei der Beurteilung früher Stadien auf. Aufgrund der Heterogenität der CLL mit sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen sind Prognose und Abschätzung der optimalen Therapie schwierig. Zur Abschätzung der Prognose können die Lymphozytenverdopplungszeit und der Serumspiegel verschiedener Proteine wie z.B. lösliches CD23, Thymidinkinase und β_2 -Mikroglobulin herangezogen werden. Außer der allogenen Stammzelltransplantation, die aufgrund des meist hohen Alters der Patienten oftmals nicht in Frage kommt, steht derzeit keine kurative Therapie zur Verfügung. Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko werden zumeist nur überwacht. Eine Erstlinientherapie von Patienten in guter körperlicher Verfassung erfolgt außerhalb klinischer Studien standardmäßig mit Fludarabin und/oder Cyclophosphamid in Kombination mit Rituximab (FCR- Schema)²⁵¹ und erzielt gute Remissionsraten. Bei eingeschränkter Nierenfunktion und /oder erhöhter Komorbidität stehen als Alternativen mit Bendamustin und Chlorambucil zur Verfügung. Die progressionsfreien Intervalle bis zum Rezidiv sind allerdings oft nur kurz. Inzwischen wurden mit Ibrutinib und Idelalisib zwei *small molecule inhibitors* zugelassen. Ibrutinib ist ein oral einzunehmender Bruton-Tyrosinkinaseinhibitor. Diese Tyrosinkinase spielt eine Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung in B-Lymphozyten. Idelalisib hemmt selektiv die Phosphatidylinositol-3-kinase delta und führt so zur Hemmung der Zellproliferation. Bei einer Studie mit 220 CLL-Patienten wurde die Wirksamkeit einer Kombination von Rituximab und Idelalisib gegenüber Rituximab und Placebo geprüft. Die Kombination des Antikörpers mit dem Tyrosinkinaseinhibitor erzielte bei 81% der Patienten eine Remission. Innerhalb der Placebogruppe lag die Remission bei 13%. Die Studie wurde nach der ersten Zwischenauswertung abgebrochen und die Patienten alle mit Rituximab und Idelalisib in Kombination weiterbehandelt.²⁸⁶ Des Weiteren verspricht die selektive pharmakologische Hemmung des Bcl-2 Signalweges eine neue therapeutische Strategie.

Die Proteine der B-Zell CLL/Lymphom 2 (Bcl-2) Familie sind der Schlüssel zur Regulierung des Apoptoseprozesses. Die Bcl-2 Familie umfaßt pro- und antiapoptotische Proteine. Die Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der antiapoptotischen Proteine ist ein Mechanismus der malignen Zelle um dem programmierten Zelltod auszuweichen. Die Bcl-2 Inhibitor ABT-263 wies eine hohe orale Bioverfügbarkeit auf, hatte jedoch zunächst schwerwiegende Thrombozytopenien zur Folge. Die Verbindung wurde jedoch überarbeitet um einen hochwirksamen, oral verfügbaren und Bcl-2 spezifischen Inhibitor ABT-199 zu entwickeln. Verschiedene weitere Substanzen und monoklonale Antikörper befinden sich zudem in klinischen Studien.²⁵² Bisher sind die beiden Antikörper Alemtuzumab (anti-CD52) und Rituximab (anti-CD20) zugelassen und werden vor allem in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika eingesetzt. Einzig für Rituximab konnte bislang eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von CLL-Patienten nachgewiesen werden.²⁵³ Es scheint ein Zusammenhang zwischen Rituximab-induzierten Signalen und der Wirksamkeit parallel verabreichter zytotoxischer Chemotherapeutika zu bestehen.^{254,255} Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Rituximab an oberflächenexprimiertes CD20 von B-Zellen Apoptose induzieren kann. Dabei kommt es zur Aktivierung von Kaspasen und zum Abbau von zellulären Proteinen und der DNA. Außerdem aktiviert Rituximab das Komplementsystem, und wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, ist die Induktion von ADCC ein wichtiger Wirkmechanismus von Rituximab.²⁵⁵ Auf letzteren Punkt wird in Kapitel 2.5 näher eingegangen. Rituximab führt mit Hilfe der erwähnten Mechanismen nicht nur zur Elimination der malignen B-Zellen, sondern auch der gesunden CD20-positiven B-Zellen. Nach etwa 9-12 Monaten hat sich die B-Zell-Population wieder erholt,²⁵⁵ aber die häufig beobachtete Herunterregulation der CD20-Expression auf den Zielzellen nach Rituximab-Behandlung führt zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber weiterer Antikörper-Therapie.²⁵⁶

2.7 NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung der Leukämien

Wie bereits beschrieben, spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Tumoren.⁷⁸ Die Rolle von NK-Zellen bei der Immunabwehr von malignen hämatopoetischen Erkrankungen hat in den letzten Jahren ein stark zunehmendes Interesse erlangt. So wurde gezeigt, dass z.B. nach haploidenter Stammzelltransplantation (SCT) Alloreaktivität von NK-Zellen generiert wird, die mit klinischen Vorteilen einhergeht.⁹⁰ Verschiedene Studien zeigen eine geringere Suszeptibilität von ALL im Vergleich zu AML-Zellen im haploidentem Setting bezüglich des *Graft versus Leukemia* (GvL)-Effekts durch NK-Zellen.^{257,258} Aber auch autologe NK-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung maligner

hämatopoetischer Neoplasien zu spielen. So wurde beschrieben, dass die Anzahl und Aktivität von NK-Zellen im Blut von Leukämiepatienten im Vergleich zu gesunden Personen reduziert und die Aktivität der NK-Zellen mit dem Überleben der Leukämiepatienten assoziiert ist.²⁵⁹⁻²⁶¹

Es ist daher von klinischem Interesse, Molekülsystem und Mechanismen, die an der NK-Zell-Reaktivität gegen maligne hämatopoetische Zellen beteiligt sind, zu erarbeiten. NK-Zellen tragen auch wesentlich zum klinischen Erfolg von therapeutischen Antikörpern in der Behandlung maligner hämatopoetischer Neoplasien bei. Der erste jemals zur Krebstherapie zugelassene Antikörper Rituximab ist zentraler Bestandteil der Standardbehandlung von CD20-positiven CLL und Non-Hodgkin-Lymphom Patienten. Aufgrund des großen Potentials von Antikörpern in der Krebstherapie zielen gegenwärtige Entwicklungen u.a. auf die Optimierung der Fc γ RIIIA-Affinität von therapeutischen Antikörpern ab, um die Immunantwort gegen Tumorzellen weiter zu verstärken.²³⁸

In der vorliegenden Arbeit sollte das Potential eines Fc-optimierten NKG2D-Fc Fusionsproteins charakterisiert werden, welches NKG2DL auf Grund ihrer stark tumorzellrestringierten Expression als Zielmoleküle für die Aktivierung der Reaktivität von NK-Zellen nutzt.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, E-max	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
FACS BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Cytomics FC500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammern & Powersupply	BioRad, München, Deutschland
MACS Separator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetteboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten & Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland

Elektroporationsküvetten	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
MACS Säulen (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Platten für ELISA (96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten für FACS (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transwell (Platten und Einsätze)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Vakuum-Filtrationssystem (steril)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Alle nicht aufgelisteten Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Agar	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BATDA reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Geneticin (G418)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Luria Broth (LB) Base	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium DMEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium IMDM	Lonza, Verviers, Belgien
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Pyruvate Solution	Lonza, Verviers, Belgien
NEAA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
PBS	PAA, Pasching, Österreich
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (rek.)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phosphate Substrate (P4744)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-114	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.4 Antikörper und Zytokine

Denosumab (Prolia®)	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
ELISA IFN- γ mAb (M700A, M701B)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Goat-anti-mouse-PE	Jackson Immunoresearch, West Grove, USA
Goat-anti-mouse-IgM-HRP	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mouse anti-human-IgG1-PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Mouse IgG1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

Mouse IgG2b	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Mouse IgM	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Panitumumab (Vectibix®)	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
Poly-HRP-Streptavidin	Fitzgerald Industries Int., Acton, MA, USA

Direkt-markierte FACS-Antikörper und die zugehörigen Isotyp-Kontrollen wurden von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) oder BioLegend (San Diego, CA, USA) bezogen.

3.1.5 Kits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SuperScript® Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Zelllinien

C1R	Universität Tübingen, Deutschland
HL-60	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
K562	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Nalm 16	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Raji	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Ammoniumchlorid-Puffer	0,8% NH ₄ Cl + 0,1 mM Na-EDTA + mit KHCO ₃ auf pH 7,4 eingestellt (hergestellt von Universitäts-Apotheke Tübingen)
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,5% Tween 20
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 0,01% NaN ₃
LB-Agarplatten	LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar (autoklaviert) + Antibiotikum
LB-Medium	2,5% (w/v) Luria Broth Base (autoklaviert)
MACS-Puffer	PBS + 0,5% FCS + 2 mM EDTA
Medium (Einfrieren)	RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO

Medium (Zellkultur)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris-HCl pH 8,0 + 5,75% (v/v) Essigsäure + 50 mM EDTA
TRAP-Substrat Solution	50 mM Na-Acetat + 100 mM Na-Tartrat + mit HCl auf pH 5,0 eingestellt + vor Verwendung Nitrophenolphosphat (2 mg/ml) zugesetzt

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologie

Sämtliche Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO₂ kultiviert. Die Zellzahl wurde unter Ausschluss toter Zellen durch Trypanblau-Anfärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 1.500 rpm für 5 min.

3.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Ein Mediumwechsel bei den verwendeten Zelllinien wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Bei Suspensionszelllinien wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Zum Umsetzen (semi-) adhärenter Zellen wurde der Kulturüberstand abgenommen (und ggf. aufbewahrt), optional vorsichtig mit PBS gewaschen, Trypsin-EDTA Solution zugegeben und für etwa 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden abgeklopft und frisches Medium zugesetzt. Alternativ wurden die Zellen mit einem Zellschaber direkt vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. Die Zellsuspension (ggf. vermischt mit aufbewahrtem Kulturüberstand semi-adhärenter Zellen) wurde anschließend zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Für geplante Versuche mit den Zellen wurden diese am Vortag frisch versorgt, um zu gewährleisten, dass sich diese zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in der Wachstumsphase befinden.

Die Versorgung der Zelllinien sowie die entsprechend verwendeten Medien können nachfolgender Übersicht entnommen werden:

Zelllinie	Zelldichte (Split)	Kulturmedium
K561	1×10^7 / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
HL-60	1×10^7 / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
Nalm16	1×10^7 / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
Raji	$1,5 \times 10^7$ / 20 ml (1:2)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
C1R neo	1×10^6 / 10 ml (1:4)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S +
C1R MICA	1×10^6 / 10 ml (1:4)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S +
C1RMICB	1×10^6 / 20 ml (1:10)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S +
C1RULBP1	1×10^6 / 20 ml (1:10)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S +

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurden diese einen Tag nach dem Umsetzen aus der Kulturflasche entnommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 5×10^6 je ml in sterile Cryoröhrchen (je 1 ml) eingefroren (-80°C). Nach wenigen Tagen wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in Stickstoff-Tanks überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Cryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, die Zellen sofort in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben.

3.2.1.3 Spender primären Materials

Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission und mit dem freiwilligen Einverständnis der Spender wurde Material zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) sowohl von Leukämie-Patienten als auch von gesunden Spendern gewonnen. Material von Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Beginn der Therapie entnommen.

3.2.1.4 Isolation von PBMC

Zur Isolation von PBMC von gesunden Spendern wurde frisch abgenommenes Vollblut zur Gerinnungshemmung mit Heparin versetzt, Buffy-Coat- oder Leukaphereseprodukte der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Patientenmaterial wurde, ebenfalls mit Heparin versetzt, direkt nach der Abnahme aufgearbeitet.

Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem gespendeten Material (peripheres Blut oder KM) aufgearbeitet. Die isotonische Ficoll-Lösung (Ficoll-Hypaque) enthält ein synthetisches, stark verzweigtes und vernetztes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) und besitzt daher eine Dichte von etwa 1,077 g/ml. Während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) bei der Fraktionierung aufgrund ihrer niedrigeren Dichte in der Interphase zwischen Plasma (enthält die Thrombozyten) und Ficoll-Lösung anreichern, durchdringen Zellen mit einer höheren Dichte (Erythrozyten und Granulozyten) die Ficoll-Lösung und bilden ein Sediment.

Zum Auftragen der Blutprobe wurden diese zumeist 1:3 mit PBS verdünnt. 15 ml vorgelegter Ficoll-Lösung wurden anschließend mit 35 ml des Blut-PBS-Gemisches überschichtet. Nach der Zentrifugation (2.000 rpm für 18 min; ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphase abgenommen und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (1.500 rpm für 5 min). Zur Entfernung der Thrombozyten erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (800 rpm für 10 min). Anschließend wurden die Zellen je nach Verwendungszweck in Kulturmedium oder PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Gesunde PBMC für nachfolgende Experimente wurden mit 8×10^6 Zellen je ml in Kultur genommen (optional mit Zusatz von Zytokinen).

3.2.1.5 Isolation ruhender/naiver NK-Zellen

Zur Gewinnung von hochreinen Zellpopulationen wurde das Prinzip der MACS-Separation (*Magnetic Activated Cell Sorting*) angewendet. Dieses basiert auf der negativen Selektion der gewünschten Zellen (diese bleiben unbeeinflusst) durch magnetische Markierung aller unerwünschten Zellen via deren spezifischen Oberflächenmoleküle (z.B. CD3 für T-Zellen und CD19 für B-Zellen). Die genaue Zusammensetzung des primären Antikörper-Cocktails (Biotin-markiert) ist unbekannt, dieser richtet sich allerdings gegen alle Zellen unter den PBMC außer NK-Zellen. Der sekundäre Antikörper (anti-Biotin) ist mit Magnet-Beads gekoppelt und bindet spezifisch an den primären Antikörper. So werden die Antikörper-markierten Zellen in einem starken Magnetfeld in der MACS-Säule zurückgehalten, während die unmarkierten NK-Zellen diese durchlaufen und so angereichert werden. Die Reinheit der Populationen wurde anschließend mittels FACS-Analyse bestimmt ($CD56^+CD3^-$ für NK-Zellen) und lag in der Regel bei über 95%. Zur Gewinnung von reinen NK-Zellen aus frisch isolierten PBMC wurden das *NK Cell Isolation Kit* gemäß den Herstellerprotokollen verwendet.

3.2.1.6 Generierung von polyklonalen NK-Zellen (pNKC)

Zur Herstellung polyklonaler NK-Zellen wurden zunächst PBMC aus Vollblut oder Leukaphereseprodukten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, auf 1×10^7 Zellen je ml eingestellt, in eine Zellkulturflasche überführt und anschließend für 1 h im Brutschrank inkubiert. Durch vorsichtige Entnahme des Überstandes konnten die an die Kunststoffoberfläche adhärenen Monozyten aus dem Zellgemisch entfernt werden. Der Überstand wurde zentrifugiert und die Zellen anschließend in Kulturmedium (mit dem Zusatz von 2 mM L-Glu und 50 U IL-2 je ml) aufgenommen und auf 8×10^5 Zellen je ml eingestellt. Zellen der Linie RPMI 8866 dienten als Feeder-Zellen. Diese wurden mit 30 Gray bestrahlt, einmal mit PBS gewaschen (1.500 rpm für 5 min) und in Kulturmedium (versetzt mit 2 mM L-Glu) auf 2×10^5 Zellen je ml eingestellt. Von beiden Zellsuspensionen wurden nun jeweils 500 µl in die inneren 8 wells einer 24 well-Platte pipettiert; in die äußeren wells wurde jeweils 600 µl PBS als Verdunstungsschutz gegeben. Die Platten wurden für 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Jeden zweiten Tage wurde jedem well 200 µl Überstand entnommen und 200 µl frisches Medium (mit 25 U IL-2 je ml) zugesetzt. Am Tag 10 wurde die Reinheit der polyklonalen NK-Zellen ($CD56^+CD3^-$) mittels FACS-Analyse ermittelt.

3.2.3 Durchflußzytometrie

Die Expression verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die zu untersuchenden Zellen wurden dazu mit Zielmolekül-spezifischen Antikörpern, direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, angefärbt. Die Analyse erfolgte hauptsächlich mit dem Cytomics FC 500, zur Auswertung wurde die integrierte Software oder das Analyse-Programm FlowJo 7.6 verwendet.

Bei der Messung werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und durch einen gebündelten Laserstrahl geführt. So kommt es zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern im Durchflußzytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal. Unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich eine Aussage über die Größe und Granularität treffen.

3.2.3.1 Allgemeines Protokoll

Zur Färbung wurden unmarkierte (primäre) Antikörper mit einer Konzentration von 10 µg/ml (ebenso die Isotyp-Kontrollen) eingesetzt. Sekundäre Antikörper wurden 1:100 bis 1:200

verdünnt und direkt markierte Antikörper wurden 1:25 (Isotyp-Kontrollen 1:50) verdünnt eingesetzt. Alle Antikörperverdünnungen wurden in FACS-Puffer mit humanem IgG (10 µg/ml) hergestellt und jeweils mit 50 µl zur Färbung eingesetzt.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die zu untersuchenden Zellen in FACS-Puffer mit 10 µg/ml humanem IgG aufgenommen und 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer 96 well-Platte je nach Anzahl verschiedener Färbungen verteilt und in der Platte zentrifugiert (2.000 rpm für 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der primären Antikörperlösung resuspendiert. Nach der Inkubation (30 min bei 4°C) wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Um gebundenen primären Antikörper zu detektieren, wurde das Zellpellet anschließend in sekundärer Antikörperlösung resuspendiert und die Zellen für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zweimal gewaschen und ggf. erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit direkt-markierten Antikörpern (20 min bei 4°C im Dunkeln). Danach wurden die Zellen noch einmal gewaschen und das Zellpellet wurde in 300 µl FACS-Puffer oder 1% PFA-PBS-Lösung resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.2.3.2 Protokoll zum Nachweis der Bindung von Fusionsproteinen

Zum Nachweis der Bindung von NKG2D-Fc Fusionsproteinen an NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von Zielzellen wurden die Zellen in FACS-Puffer (ohne humanes IgG oder alternativ mit 10 µg/ml mouse IgG) aufgenommen, inkubiert, in eine 96 well-Platte gegeben und anschließend zentrifugiert. Die Fusionsproteine wurden auf 10 µg/ml in FACS-Puffer (ohne humanes IgG) verdünnt und mit 50 µl zur Färbung eingesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde zweimal gewaschen und das Zellpellet in sekundärer Antikörperlösung (mouse-anti-human-IgG1-PE; 1:200 in FACS-Puffer) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde erneut gewaschen. Optional wurden die Zellen anschließend mit direkt-markierten Antikörpern gefärbt (10 min bei RT), anschließend in FACS-Puffer oder 1% PFA-PBS-Lösung resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

3.2.4 Analyse der NK-Zell-Aktivität

3.2.4.1 NK-Zell-Zytotoxizität (BATDA-Europium-Assay)

Die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen eine spezifische Zellpopulation wurde mit Hilfe des BATDA-Europium-Assay analysiert. Dazu wurden die Zielzellen mit BATDA (2,2':6',2''-

terpyridine-6,6''-dicarboxylacid acetoxymethylester) vorinkubiert, dessen Esterbindung nach Aufnahme in die Zelle hydrolysiert wird, wodurch der aktivierte Ligand (TDA) somit in der Zelle verbleibt und nur durch Lyse der Zielzellen in den Kulturüberstand abgegeben wird. Durch Bindung des freigesetzten Liganden an das zugegebene Europiumsalz bildet sich ein stabiler Chelat-Komplex (EuTDA), dessen Fluoreszenzsignal direkt mit der Anzahl lysierter Zellen korreliert. Die spezifische Lyse wurde folgendermaßen berechnet:

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

Die Zielzellen wurden mit 2×10^6 in 2 ml Kulturmedium aufgenommen, mit 4 μl BATDA-Lösung versetzt und für 1 h unter regelmäßigem Schütteln bei 37° inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit warmem Medium gewaschen (Zentrifugation bei 300 g für 7 min) und auf 5×10^4 Zellen je ml eingestellt. Optional wurden nun Antikörper oder Fusionsproteine in entsprechender Konzentration zugesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μl je well in eine 96 well-Platte (5×10^3 Zielzellen je well) gegeben. Die Effektorzellen wurden entsprechend des gewünschten Verhältnisses von Effektor- zu Zielzelle (E:T Ratio) eingestellt und mit 100 μl je well zu den vorgelegten Zielzellen pipettiert. Anstatt Effektorzellen wurden 100 μl Medium für den Spontanrelease bzw. 100 μl 1%-ige Triton X-100-Lösung zur Bestimmung des Maximalrelease zu den Zielzellen gegeben. Anschließend wurden die Platten kurz zentrifugiert (100 g für 2 min) und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (200 g für 5 min), 20 μl des Überstandes entnommen, mit 200 μl Europium-Lösung in einer 96 well-Platte vermischt und anschließend die Fluoreszenz bestimmt.

3.2.4.2 NK-Zell-Degranulation (CD107a-Assay)

Die Oberflächenexpression von CD107a bei NK-Zellen dient als Nachweis für die Ausschüttung lytischer Granula (Degranulation), da dieses Protein bei der Verschmelzung von Vesikel- mit Zellmembran an die Zelloberfläche gelangt. Die CD107a-Expression korreliert mit der NK-Zell-vermittelten Lyse der Zielzellen und kann als Surrogatmarker für die NK-Zell-Reaktivität verwendet werden.

Für einen Ansatz (Endvolumen 400 μl) wurden die Zielzellen in einer 24 well-Platte vorgelegt, optional Antikörper oder Fusionsproteine zugegeben und 30 min vorinkubiert, und anschließend 1×10^6 bzw. 2×10^6 Effektorzellen (polyklonale NK-Zellen bzw. PBMC und Splenozyten) zugegeben (E:T Ratio's 1:1 bis 5:1). Zur Analyse der Reaktivität autologer NK-Zellen innerhalb der Patienten-PBMC wurde das Primärmaterial aufgetaut, auf 1×10^7 Zellen je ml (etwa 400 μl je Probe) eingestellt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden

Antikörper bzw. Fusionsproteine zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h wurden die Zellen zentrifugiert und zur FACS-Analyse auf CD107a und die entsprechenden Selektionsmarker angefärbt (CD56⁺CD3⁻ bzw. NKp46⁺CD3⁻ für humane NK-Zellen und NKp46⁺CD3⁻ für NK-Zellen innerhalb der murinen Splenozyten).

3.2.4.3 Freisetzung von IFN- γ (Kokultur)

Neben der Zytotoxizität ist die Produktion von IFN- γ eine weitere wichtige Funktion von NK-Zellen und wird ebenso von einer Balance aktivierender und hemmender Signale reguliert. Das Maß der Freisetzung dieses Zytokins ist somit ein Indikator für die NK-Zell-Reaktivität und abhängig vom Grad der Aktivierung.

Für einen Ansatz (Endvolumen 500 μ l) wurden die Zielzellen in eine 48 well-Platte vorgelegt, optional Antikörper oder Fusionsproteine zugegeben und 30 min vorinkubiert, und anschließend $0,5 \times 10^6$ bzw. 2×10^6 Effektorzellen (polyklonale NK-Zellen bzw. PBMC und Splenozyten) zugegeben (E:T Ratio's 1:1 bis 5:1). Nach 24 h wurden die Kulturüberstände zentrifugiert (3.500 rpm für 6 min), eingefroren und anschließend im ELISA analysiert.

3.2.4.4 Fc-Rezeptor-Signaling

Zur Analyse der Induktion aktivierender Signale über den Fc-Rezeptor (CD16) von NK-Zellen durch die Fc-Anteile der verschiedenen Fusionsproteine wurden NK-Zellen mit den Fusionsproteinen in Abwesenheit von Tumorzellen inkubiert. Um potentielle Einflüsse der Modifikationen in den Fc-Anteilen auf das Coating-Verhalten der Fusionsproteine auszuschließen, wurden wells einer 48 well-Platte mit einem murinen anti-NKG2D-Antikörper gecoatet (10 μ g/ml in PBS; ÜN bei 4°C). Die Platte wurde mit PBS gewaschen, zum Blocken für 2 h mit Kulturmedium bei 37°C inkubiert und anschließend die Fusionsproteine bzw. Kontrollen (10 μ g/ml) zur Bindung an den anti-NKG2D-Antikörper zugegeben und nach 2 h erneut mit Medium gewaschen. Danach wurden die Effektorzellen mit 1×10^6 bzw. 3×10^6 Zellen je well (polyklonale NK-Zellen bzw. PBMC und Splenozyten) in einem Endvolumen von 500 μ l auf den immobilisierten Fusionsproteinen für 24 h kultiviert, die Kulturüberstände anschließend auf die Freisetzung von IFN- γ und die Effektorzellen im FACS auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 untersucht (Selektionsmarker CD56⁺CD3⁻ für humane NK-Zellen bzw. NKp46⁺CD3⁻ für murine NK-Zellen).

3.2.5 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Ein ELISA ist ein immunologisches Verfahren, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion zum Nachweis verschiedenster Moleküle mittels spezifischer Antigen-bindender Antikörper (Sandwich-ELISA). Der erste Antikörper (*capture*) wird immobilisiert und nach

dem Blocken (zur Minimierung unspezifischer Bindungen) mit Antigen-haltiger Probe inkubiert. Nach dem Waschen verbleibt Antikörper-gebundenes Antigen auf der Platte und die Bindung des zugegebenen sekundären Antikörpers (*detection*) führt zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes. Zum quantitativen Nachweis des Antigens wird anschließend Streptavidin-HRP (bei Biotin-Markierung des sekundären Antikörpers) oder ein HRP-gekoppelter tertiärer Antikörper zugegeben. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats führt die enzymatische Aktivität der HRP zu einem Farbumschlag, der die Berechnung der Antigen-Konzentration ermöglicht.

3.2.5.1 ELISA für humanes IFN- γ

Zum Nachweis von IFN- γ wurde der *capture*-Antikörper (M-700A; 0,3 $\mu\text{g/ml}$ in Carbonat-Bicarbonat-Puffer; 100 μl je well) ÜN bei 4°C auf einer 96 well-Platte immobilisiert. Der Überstand wurde abgesaugt, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA-PBS (200 μl je well) für 1 h bei RT blockiert. Die Blocklösung wurde abgesaugt und je well 50 μl Probe (in Triplets), optional verdünnt in Medium, oder Standard (in Dupletts; beginnend mit 3 ng/ml Titration 1:3) zugegeben. Die Proben wurden für 1-2 h bei RT inkubiert, anschließend biotinylierter *detection*-Antikörper (M701B; 1 $\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA-PBS; 50 μl je well) zugesetzt und für weitere 1-2 h inkubiert. Danach wurde die Platte fünfmal gewaschen, der Überstand abgesaugt, Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:80.000 in 1% BSA-PBS; 100 μl je well) zugegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurde die Platte sechsmal gewaschen, der Überstand abgesaugt und Substratlösung (100 μl je well) zugegeben. Die Reaktion wurde, in Abhängigkeit von der Farbintensität, nach etwa 15 min durch Zugabe von 1 M H_3PO_4 (100 μl je well) gestoppt und anschließend im ELISA-Reader bei 450 nm ausgelesen.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Charakterisierung von NKG2D-Fc Fusionsproteinen

4.1.1 Generierung von NKG2D-Fc Fusionsproteinen

Die tumorassoziierte Expression der NKG2DL und die die NK-Reaktivität beeinträchtigende Wirkung der sNKG2DL bildete die Grundlage für die Idee, NKG2DL bei Patienten mit malignen Erkrankungen als Zielantigen für ein Fc-modifiziertes NKG2D-Ig Fusionsprotein zu nutzen. Durch die Bindung des Fusionsproteins sollte eine potente Aktivierung der NK-Zell ADCC gegen die Tumorzellen induziert und gleichzeitig die inhibitorischen Effekte der löslichen Liganden neutralisiert werden. Da von Tumorzellen nicht bzw. in den seltensten Fällen alle NKG2DL exprimiert werden, sondern ein differenzielles Expressionsmuster vorliegt, erschien es uns nicht sinnvoll, einen einzelnen Liganden als Zielmolekül zu wählen. Deshalb wurde in Kooperation mit Dr. Grosse-Hovest aus der Abteilung Immunologie ein Fusionsprotein generiert, welches aus der extrazellulären Domäne von NKG2D (F78-V216), die alle NKG2DL binden kann und einem humane IgG1 Fc-Teil (P217-K447; Δ_{CH1} Domäne; Substitution Cys zu Ser an Position 220) besteht. Um Fusionsproteine mit Fc-Teilen zu erhalten, die im Vergleich zum Wildtyp NKG2D-Fc (NKG2D-Fc-WT) eine deutlich verstärkte (NKG2D-Fc-ADCC) oder verminderte (NKG2D-Fc-KO) Affinität zum Fc γ RIIIa aufweisen, wurden in der Sequenz der Fc-Teile folgende Aminosäuren ausgetauscht: S239D/I332E (NKG2D.Fc-ADCC) bzw. E233P/L234V/ Δ G236/A327G/A330S (NKG2D-Fc-KO). Beide Modifikationen sind in der Literatur beschrieben.^{237, 276} Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung eines dimeren NKG2D-Fc Fusionsproteins.

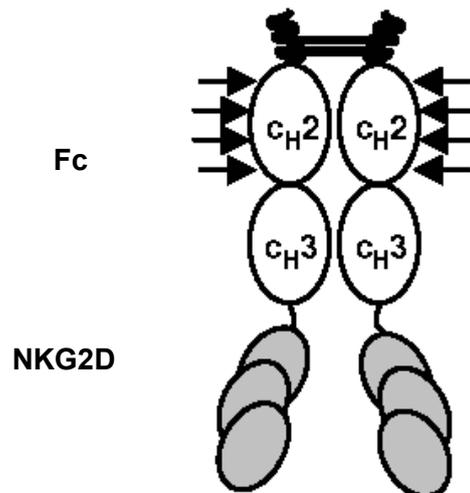


Abbildung 2: Schematische Darstellung des NKG2D-Fc Fusionsproteins. Als dimere Konstrukte bestehen die Fusionsproteine aus der extrazellulären Domäne des NKG2D-Rezeptormoleküls (F78-V216) und einem humanen Fc-Teil (P217-K447), dessen Sequenz keine Modifikationen aufweist (NKG2D-Fc-WT) oder verschiedene Aminosäureaustausche enthält (durch die Pfeile angedeutet), um die Affinität zum Fc-Rezeptor auf NK-Zellen zu verstärken (NKG2D-Fc-ADCC) bzw. auszuschalten (NKG2D-Fc-KO).

4.1.2 Bindung der Fusionsproteine an membranständige NKG2DL

Zur Charakterisierung der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an NKG2DL mittels Durchflusszytometrie wurden zunächst NKG2DL-Transfektanten verwendet.

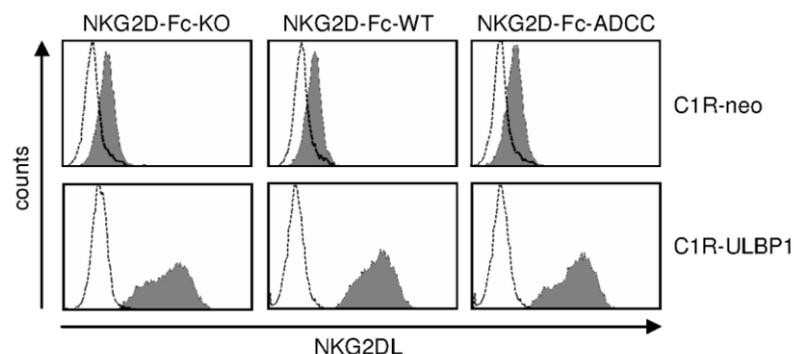


Abbildung 3: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine. C1R-neo Transfektanten mit nur geringer Oberflächenexpression von NKG2DL und ULBP1-transfizierte C1R Zellen (C1R-ULBP1) wurden mit den verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteinen inkubiert und mittels FACS untersucht. Ausgefülltes Histogramm, NKG2D-Fc-Färbung; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

Abbildung 3 zeigt die FACS-Analyse der Transfektanten. Während nur ein geringes Signal bei den Kontrollzellen zu detektieren war, zeigten die verschiedenen Fusionsproteine, unabhängig von den Modifikationen ihres Fc-Teils, eine deutliche Bindung an die NKG2DL-transfizierte Zelllinie. Die Detektion der Bindung der Fusionsproteine auf der Oberfläche der C1R-neo Transfektanten lässt sich dadurch erklären, dass diese Zellen ebenfalls eine geringfügige Oberflächenexpression der NKG2DL aufweisen.

Die Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine konnte auch an NKG2DL-tragenden Leukämiezelllinien aller Entitäten (AML: HL60; CML: K562; ALL: NALM16; CLL: RAJI) via FACS-Analysen gezeigt werden (s. Abbildung 4).

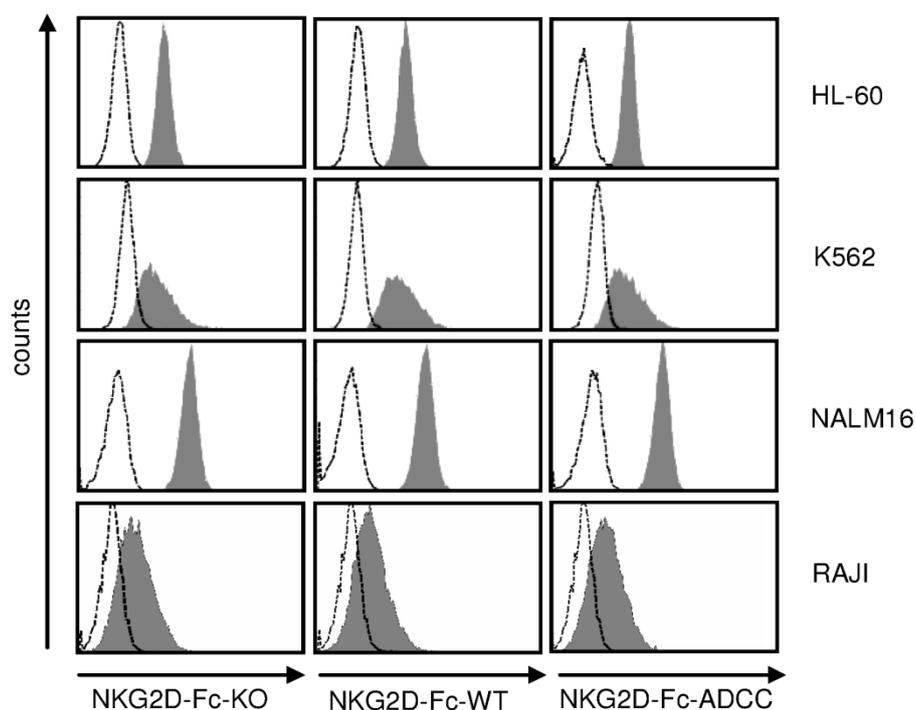


Abbildung 4: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an NKG2DL-exprimierende Zelllinien. Die genannten Leukämiezelllinien wurden mit den verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteinen inkubiert und mittels FACS untersucht. Ausgefülltes Histogramm, NKG2DFc - Färbung; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

Weiterhin wurde untersucht, ob die NKG2D-Domäne der Fusionsproteine auch NKG2DL auf primären Leukämiezellen binden kann. Entsprechend wurden maligne Zellen von AML- und CLL-Patienten mit dem NKG2D-Fc-KO Fusionsprotein inkubiert und dessen Bindung im FACS untersucht. Dabei wurde bewusst NKG2D-Fc-KO verwendet, um eine Fehlbindung an von Tumorzellen exprimierte Fc-Rezeptormoleküle auszuschließen. Wie Abbildung 5 zeigt, konnte auch bei Patientenzellen eine Bindung des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

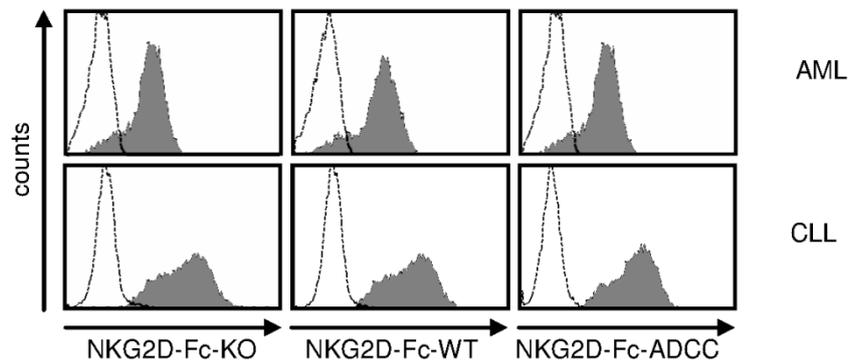


Abbildung 5: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an primäre Leukämiezellen. Zellen von AML- und CLL-Patienten wurden mit NKG2D-Fc-KO inkubiert und zur FACS-Analyse mit Selektionsmarkern charakterisiert. Ausgefülltes Histogramm, NKG2D-Fc-Färbung; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

4.1.3 Affinität der Fusionsproteine zu CD16

Des Weiteren überprüften wir die differenzielle Affinität der Fc-Teile unserer Fusionsproteine zum Fc-Rezeptor von NK-Zellen ($Fc\gamma RIIIa$, CD16). Für diese Versuche wurden polyklonale NK-Zellen (Reinheit von mindestens 90%) verwendet. Wie in Abbildung 6 gezeigt, konnte bei Inkubation der NK-Zellen mit NKG2D-Fc-KO keine Bindung des Fusionsproteins via FACS-Analyse nachgewiesen werden, während das NKG2D-Fc-WT Fusionsprotein eine deutliche Bindung aufwies, die vom NKG2D-Fc-ADCC noch deutlich übertroffen wurde.

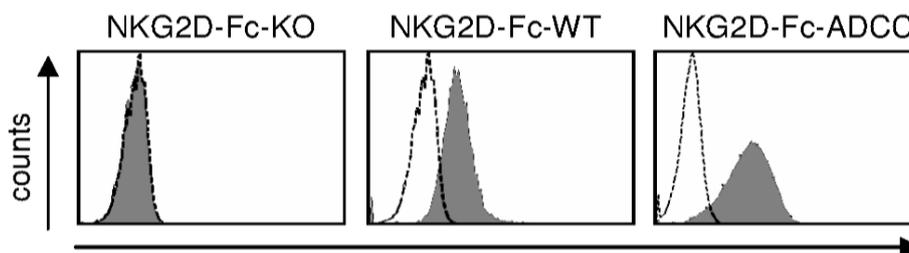


Abbildung 6: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an polyklonale NK-Zellen. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (10 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde via FACS-Analysen die Bindung der Fusionsproteine überprüft. Ausgefülltes Histogramm, NKG2D-Fc-Färbung; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

4.1.4 Funktionelle Charakterisierung der Fusionsproteine

Weiter untersuchten wir die Kapazität der verschiedenen Modifikationen im Fc-Teil der NKG2D-Fc Fusionsproteine, über CD16 Signale in NK-Zellen auszulösen. Um potentiell störende Einflüsse anderer Rezeptor-Liganden-Systeme auszuschließen, wurde zunächst ein Versuchsaufbau gewählt, der eine Aktivierung von NK-Zellen in Abwesenheit von Zielzellen erlaubt. Hierfür wurden NK-Zellen auf immobilisierten NKG2D-Fc Fusionsproteinen kultiviert. Die NK-Zellen wurden nach 24 Stunden via FACS-Analysen auf den Aktivierungsmarker CD69, sowie auf CD16-Expression untersucht (Abbildung 7). Die Kulturüberstände wurden zur Bestimmung der INF- γ -Konzentration abgenommen (Abbildung 8).

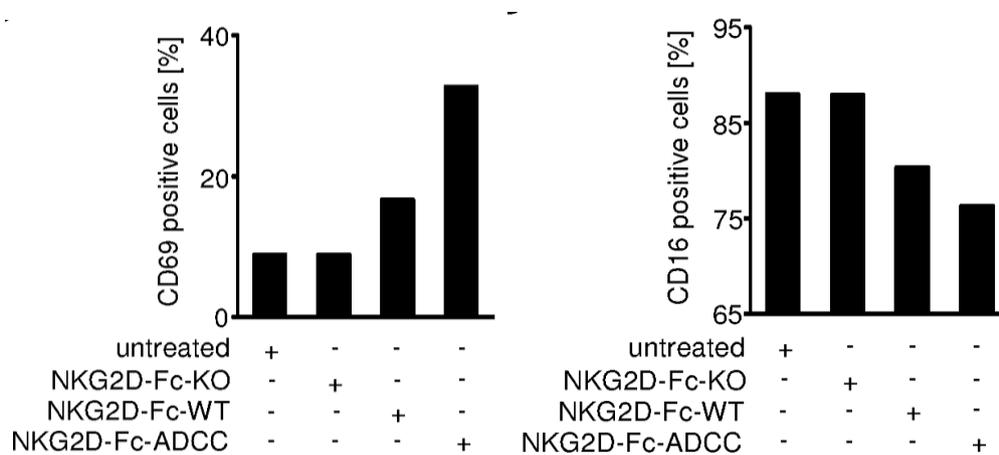


Abbildung 7: Funktionelle Charakterisierung Fc-Teile der NKG2D-Fc Fusionsproteine: NK Aktivierung und CD16 Modulation. Polyklonale NK-Zellen wurden allein oder mit den verschiedenen Fusionsproteinen (nach Immobilisierung an Plastik, 10 μ g/ml) für 24h inkubiert. Anschließend wurde mittels FACS-Analyse die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 (links) bzw die CD16-Expression (rechts) untersucht.

Mit NKG2D-Fc-KO konnte keine Induktion der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und keine Veränderung der CD16 Expression der NK-Zellen beobachtet werden. Dagegen zeigte sich eine Steigerung der CD69-Oberflächenexpression durch das NKG2D-Fc-WT, die mit einer Herunterregulation von CD16 einherging; dieser Effekt wurde von NKG2D-Fc-ADCC deutlich übertroffen.

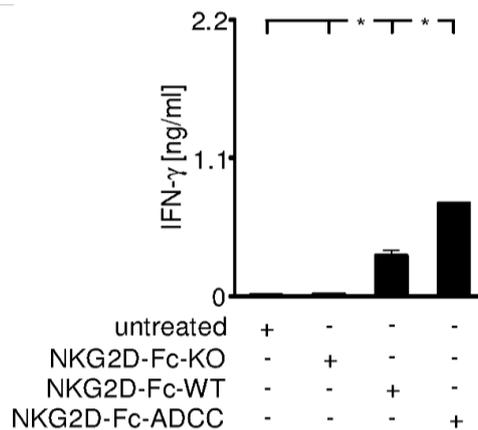


Abbildung 8: Funktionelle Charakterisierung Fc-Teile der NKG2D-Fc Fusionsproteine: Induktion von IFN-g Produktion. Polyklonale NK-Zellen wurden allein oder mit den verschiedenen Fusionsproteinen (nach Immobilisierung an Plastik, 10µg/ml) für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN-γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse von je 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Wie in Abbildung 8 gezeigt wurde die IFN-γ-Freisetzung der NK-Zellen durch NKG2D-KO-Fc nicht beeinflusst, die NK-Zell-Reaktivität jedoch durch NKG2D-WT-Fc gesteigert und durch NKG2D-ADCC-Fc noch verstärkt stimuliert.

4.2 Modulation der NK-Zell-Reaktivität gegen NKG2DL-Transfektanten

Nachfolgend sollte das Potential der NKG2D-Fc Fusionsproteine NK-Zell-Reaktivität gegen maligne NKG2DL-tragenden Zellen zu induzieren überprüft werden. Dazu wurden zunächst NKG2DL-Transfektanten als Zielzellen verwendet.

4.2.1 Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität gegen NKG2DL-Transfektanten durch NKG2D-Fc Fusionsproteine

Polyklonale NK-Zellen wurden mit jeweils 10µg/ml NKG2D-Fc Fusionsproteine inkubiert und in verschiedenen Ratios mit den Kontrollzellen (C1R-neo) und den NKG2DL-Transfektanten (C1R-ULBP1) kultiviert (Abbildung 9).

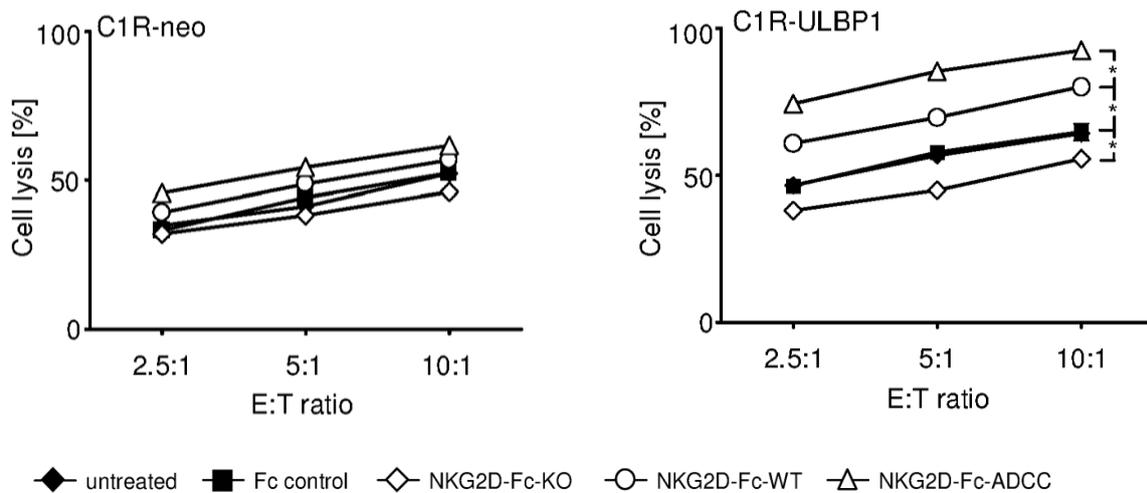


Abbildung 9: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität gegen Transfektanten durch NKG2D-Fc Fusionsproteine. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert und in 2h BATDA-Europium-Assays die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen den Transfektanten C1Rneo oder C1RULBP1 überprüft. Gezeigt sind exemplarische Ergebnisse eines von je 3 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

Wie Abbildung 9 zeigt, wurde durch die Anwesenheit der NKG2D-Fc Fusionsproteine die NK-Zell-Reaktivität erheblich beeinflusst. NKG2D-Fc-KO führte wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der NK-Zell-Reaktivität aufgrund der Blockade der aktivierenden NKG2D-NKG2DL Interaktion. Hingegen führte bereits das NKG2D-Fc-WT Fusionsprotein zu einer deutlichen Steigerung der Zellyse durch die NK-Zellen, welche durch das NKG2D-Fc-ADCC deutlich übertroffen wurde. Unsere NKG2D-Fc Fusionsproteine beeinflussten in einem geringeren Ausmaß, aber ähnlicher Weise auch die NK-Zell-Zytotoxizität gegen Mock-Transfektanten, welche verglichen mit den NKG2DL Transfektanten eine deutlich geringere, aber doch relevante NKG2DL Expression aufweisen.

4.2.2 Modulation der IFN- γ Produktion von NK-Zellen durch NKG2D-Fc Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-Transfektanten

Um den Einfluss der NKG2D-Fc Fusionsproteine auf die Zytokinproduktion der NK-Zellen zu charakterisieren, wurden polyklonale NK-Zellen mit den Transfektanten in Anwesenheit der Fusionsproteine kultiviert und die Kulturüberstände anschließend auf die Spiegel von IFN- γ analysiert (Abbildung 10).

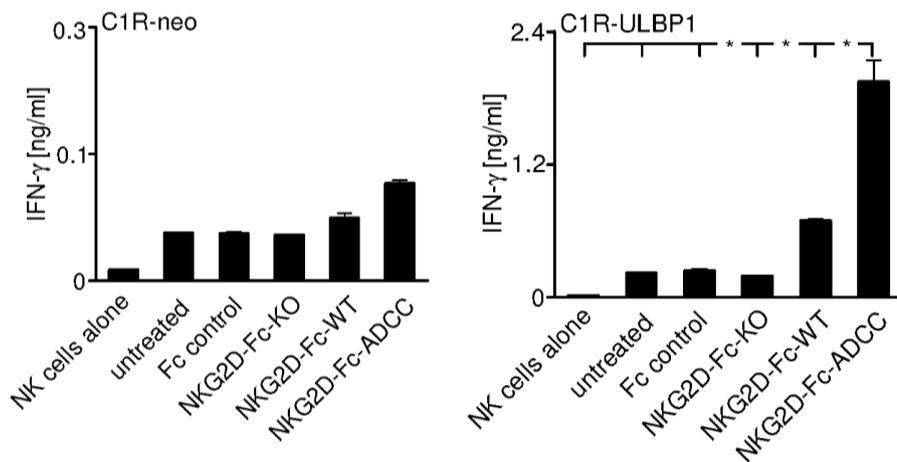


Abbildung 10: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit Transfektanten. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert, für 24h mit C1Rneo bzw. NKG2DL-transfizierten C1R-ULBP1 kultiviert und die Überstände anschließend mittels ELISA auf INF- γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse von je 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Eine Freisetzung von IFN- γ durch die NK-Zellen wurde sowohl in Gegenwart der NKG2DL-Transfektanten als auch der Mock-Transfektanten beobachtet. In Anwesenheit des NKG2D-Fc-KO wurde die IFN- γ Freisetzung etwas reduziert, wohingegen in Gegenwart von NKG2D-Fc-WT IFN- γ erhöht detektierbar war und vor allem durch das NKG2D-Fc-ADCC Fusionsprotein eine deutlich gesteigerte Freisetzung induziert wurde.

4.3 Modulation der NK-Zell-Reaktivität gegen NKG2DL-tragende Zelllinien

Um die Effekte der NKG2D-Fc Fusionsproteine auf die Reaktivität der NK-Zellen gegen Leukämiezellen zu überprüfen, wurden zunächst verschiedene Zelllinien als Modell verwendet, HL60 (AML), K562 (CML), NALM16 (ALL) und RAJI (Burkitt Lymphom). Wie bereits in den vorangehenden Experimenten mit den Transfektanten konnte auch hier die Reaktivität von NK-Zellen gegen die verwendeten Zelllinien durch die Anwesenheit der Fusionsproteine erheblich beeinflusst werden.

4.3.1 Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität gegen Zelllinien durch NKG2D-Fc Fusionsproteine

Polyklonale NK-Zellen wurden mit den verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteinen bzw. Isotypkontrolle inkubiert (jeweils 10µg/ml) und in verschiedenen Ratios mit den oben genannten Zielzellen kultiviert.

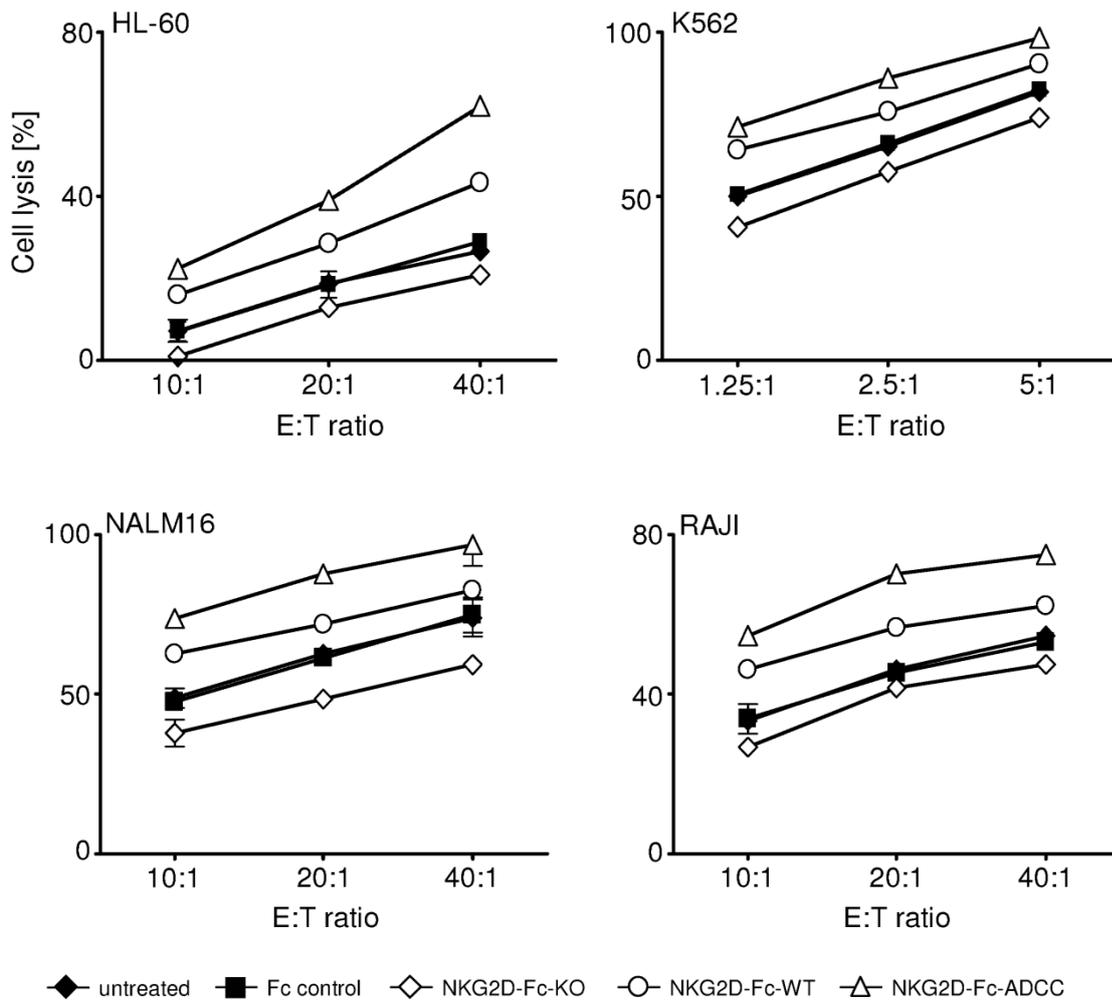


Abbildung 11: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität gegen Leukämiezelllinien. durch NKG2D-Fc Fusionsproteine Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert und in 2h BATDA-Europium-Assays die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen den NKG2DL-tragenden Leukämiezelllinien aller Entitäten überprüft. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von je 3 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der der BATDA-Europium-Assays zur Überprüfung der NK-Zell-Zytotoxizität gegen Leukämiezelllinien in Anwesenheit der Fusionsproteine. Erneut konnte gezeigt werden, dass NKG2D-Fc-KO die Zytotoxizität der polyklonalen NK-Zellen gegen die Zielzellen im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen reduziert. Wie bereits bei unseren NKG2DL-Transfektanten konnte mit NKG2D-Fc-WT eine erhöhte Lyse der

Leukämiezellen erreicht werden, die durch Anwesenheit des NKG2D-Fc-ADCC Fusionsproteine noch übertroffen wurde.

4.3.2 Modulation der IFN- γ Produktion von NK-Zellen in Kulturen mit Leukämiezelllinien durch NKG2D-Fc Fusionsproteine

Nachfolgend wurde das Potential der NKG2D-Fc Fusionsproteine zur Stimulation der IFN- γ Produktion von NK-Zellen in Kulturen mit denoben genannten Leukämiezelllinien hinsichtlich untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

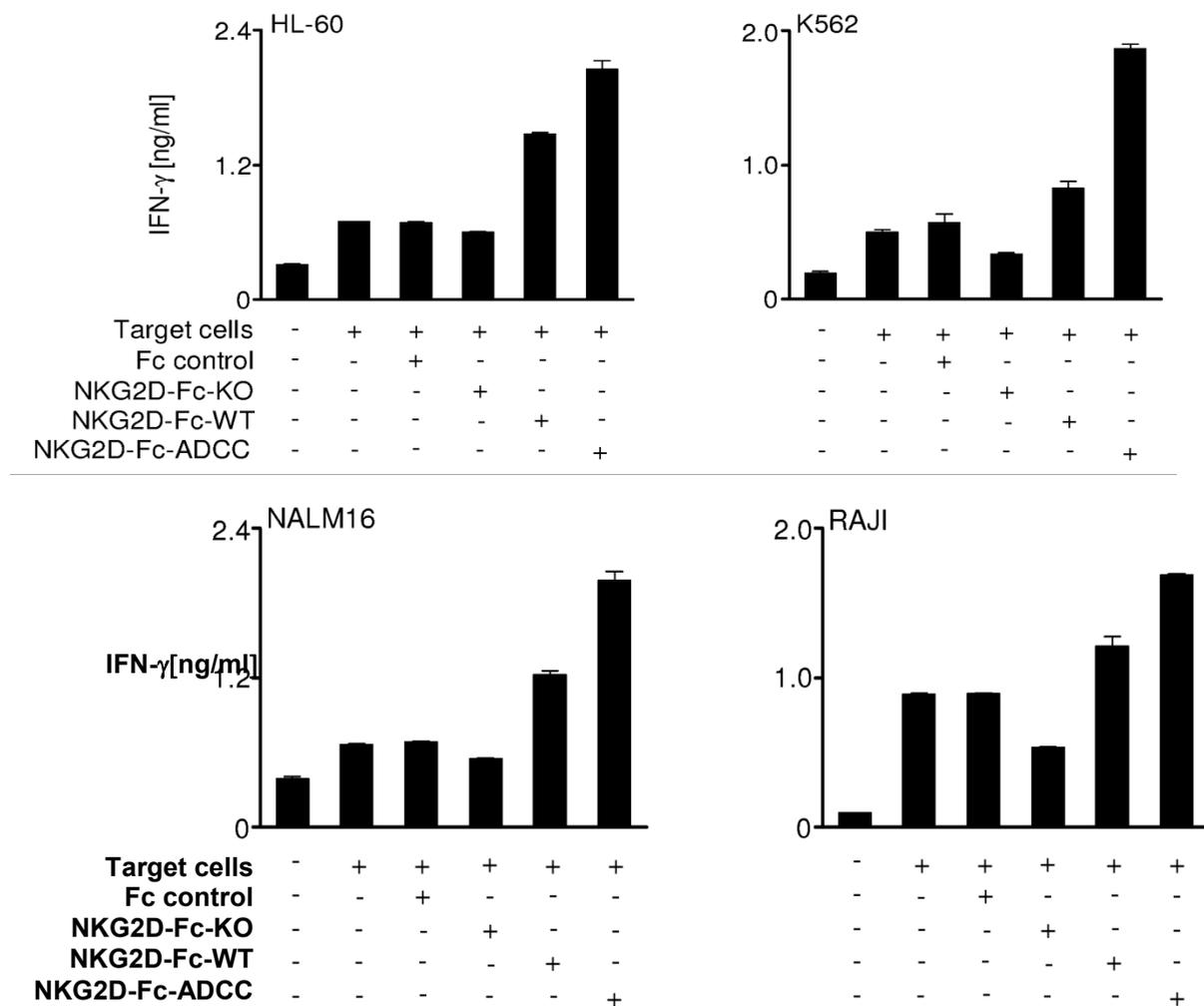


Abbildung 12: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen in Kulturen mit NKG2DL-exprimierenden Leukämiezelllinien durch die Fusionsproteine.. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert, für 24h mit NKG2DL-tragenden Zelllinien aller vier Leukämieentitäten kultiviert und die Überstände anschließend mittels ELISA auf INF- γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von je 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Bereits durch die Anwesenheit von Tumorzellen wurde die Produktion von IFN- γ der NK-Zellen erhöht und durch die Anwesenheit von NKG2D-Fc-WT noch verstärkt. Die höchste Zytokinausschüttung wurde durch die Gegenwart von NKG2D-Fc-ADCC erzielt, wohingegen NKG2D-Fc-KO in allen Experimenten einen hemmenden Effekt auf die INF- γ Produktion hatte.

4.3.3 Effekte der Fusionsproteine auf die Degranulation von NK-Zellen in Kulturen mit NKG2DL-exprimierenden Leukämiezelllinien

Die CD107a-Expression von NK-Zellen korreliert mit der NK-Zell-vermittelten Lyse und kann deshalb in Untersuchungen als Surrogatmarker für die Anti-Tumor-Reaktivität von NK-Zellen dienen.

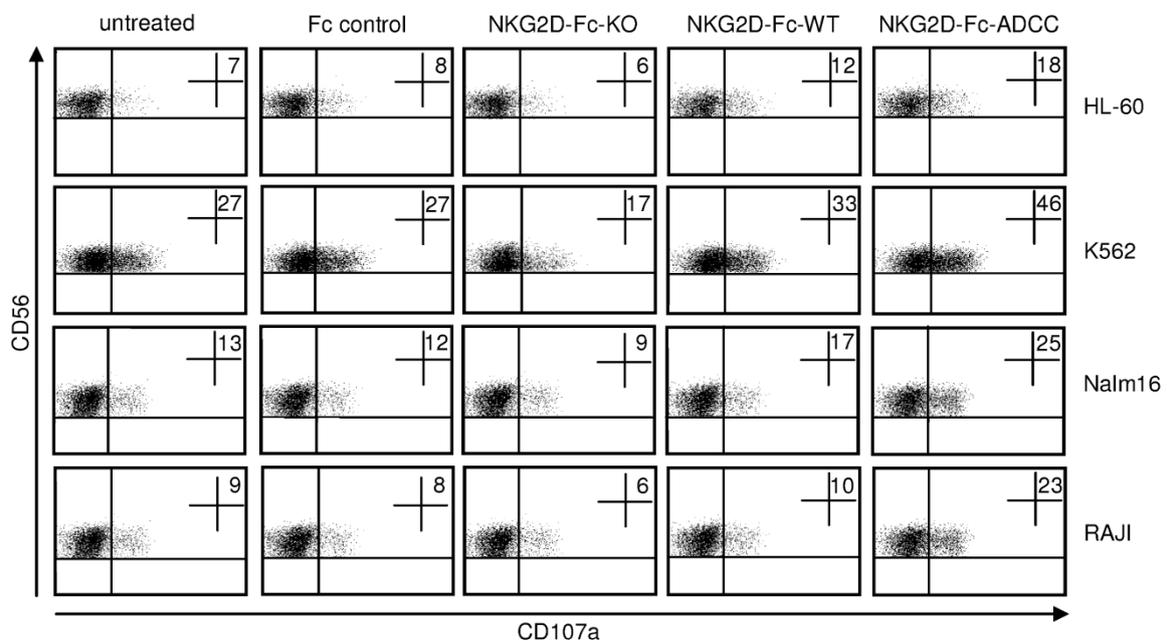


Abbildung 13: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-tragenden Zelllinien aller vier Leukämieentitäten. Allogene NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert und für 3h mit den angegebenen Leukämiezelllinien kultiviert. Im Anschluss wurde die CD107a-Expression auf den NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻ bzw. NKp46⁺CD3⁻) mittels FACS bestimmt; der prozentuale Anteil ist jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Abgebildet sind beispielhafte Ergebnisse von einem von mindestens je 3 Versuchen mit vergleichbaren Resultaten.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der CD107a-Assays von polyklonalen NK-Zellen mit Zelllinien aller vier Leukämieentitäten. Im Vergleich zu NK-Zellen allein steigert die Gegenwart von Zielzellen die CD107a-Expression, diese Steigerung wurde durch die

vorherige Inkubation der NK-Zellen mit Fc-Isotypkontrolle (10µg/ml) nicht beeinflusst. Die Behandlung mit NKG2D-Fc-WT führte in allen Versuchen zu einem Anstieg der CD107a-Expression. Der größte Effekt wurde erneut in Anwesenheit von NKG2D-Fc-ADCC erzielt, während NKG2D-Fc-KO einen hemmenden Effekt hatte.

4.4 Evaluation der NKG2D-Fc Fusionsproteine mit primären Leukämiezellen

4.4.1 Induktion von NK-Zell Zytotoxizität gegen primäre Leukämiezellen

Nachfolgend wurde das Potential der NKG2D-Fc Fusionsproteine zur Stimulation von NK-Zell Reaktivität gegen primäre Leukämiezellen, die NKG2DL exprimieren, untersucht. Aus technischen Gründen bzw. auf Grund der Verfügbarkeit von geeignetem Patientenmaterial wurden diese Untersuchungen nicht mit ALL und CML Proben durchgeführt. Zunächst wurden die Effekte auf die Zytotoxizität von polyklonalen NK-Zellen gegen Zellen von AML- und CLL-Patienten analysiert (Abbildung 14, 15 und 16). Wie zuvor bei den Transfektanten und den Leukämiezelllinien war eine deutliche Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität durch das NKG2D-Fc-WT und vor allem durch NKG2D-Fc-ADCC zu beobachten, während das NKG2D-Fc-KO eine Inhibierung der NK-Zell-Reaktivität im Vergleich zur Kontrolle bewirkte.

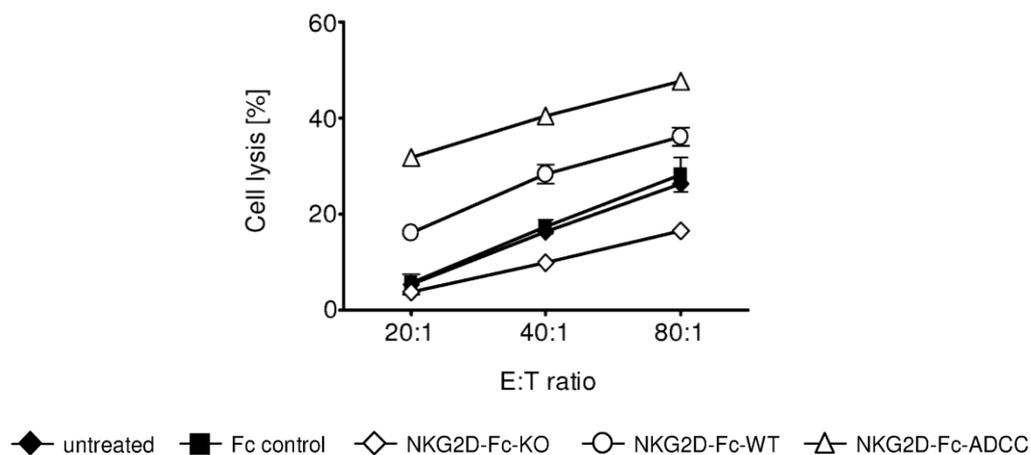


Abbildung 14: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre AML-Zellen. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert und in 2h BATDA-Europium-Assays die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen NKG2DL-positive Tumorzellen von AML-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen mindestens 80%) überprüft. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

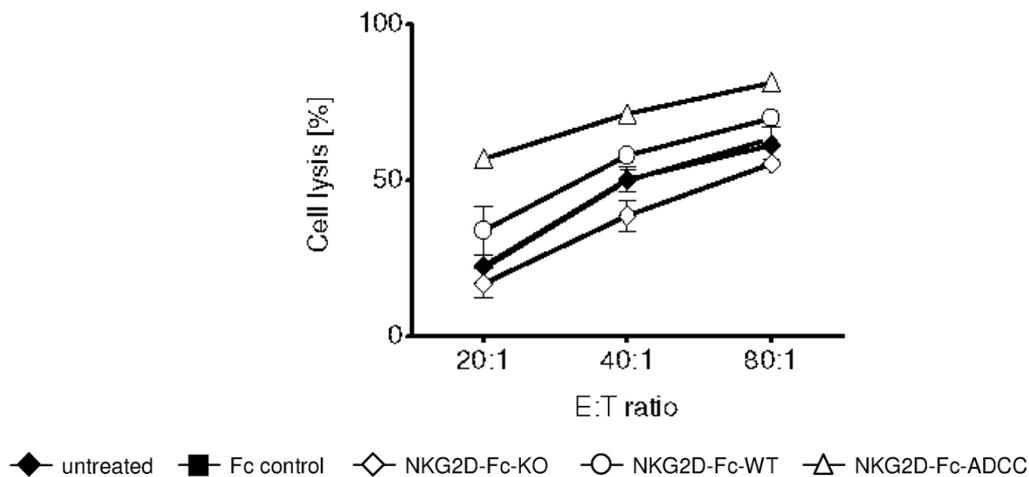


Abbildung 15: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre CLL-Zellen. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert und in 2h BATDA-Europium-Assays die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen NKG2DL-positive Tumorzellen von CLL-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen 80%) überprüft. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

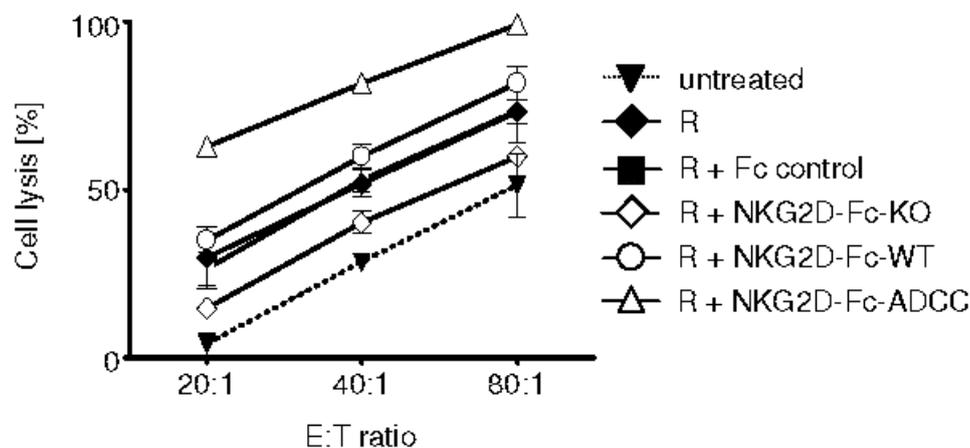


Abbildung 16: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre CLL-Zellen in Gegenwart von Rituximab (R). Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert in Anwesenheit von Rituximab (10µg/ml) und in 2h BATDA-Europium-Assays die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen NKG2DL-positive Tumorzellen von CLL-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen 80%) überprüft. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

Da Rituximab häufig in der Therapie von CLL eingesetzt wird und sein therapeutischer Effekt zu einem großen Teil durch Induktion von ADCC vermittelt wird, analysierten wir auch, wie unsere Konstrukte die NK-Zell-Zytotoxizität bei paralleler Behandlung der primären CLL-Zellen mit dem therapeutischen CD20 Antikörper beeinflussen. Wie Abbildung 14 zeigt, blieben dabei die grundlegenden Effekte der verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteine auch in Gegenwart von Rituximab bestehen und ermöglichen eine weitere Steigerung der NK Reaktivität.

4.4.2 Induktion von NK-Zell-Zytokinfreisetzung durch die Fusionsproteine in Kulturen mit primären Leukämiezellen

Zur Analyse der Kapazität der verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteine, die Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen in Anwesenheit primärer Leukämiezellen zu modulieren, wurden polyklonale NK-Zellen mit den Fusionsproteinen und Zellen von AML- und CLL-Patienten kultiviert und die Effekte auf die Zytokinfreisetzung mittels ELISA untersucht (Abbildung 17, 18, 19).

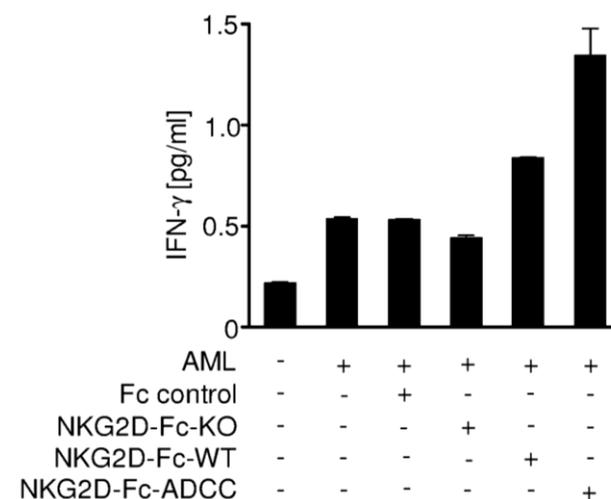


Abbildung 17: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit primären AML Zellen. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert, für 24h mit NKG2DL-positiven Tumorzellen von AML-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen mindestens 80%) kultiviert und die Überstände anschließend mittels ELISA auf INF- γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

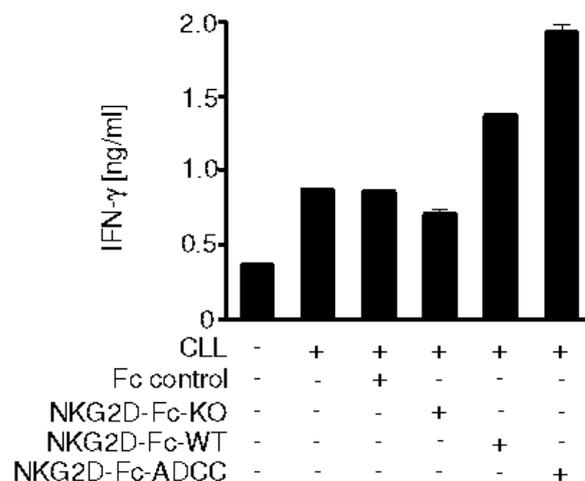


Abbildung 18: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit primären CLL Zellen. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert, für 24h mit NKG2DL-positiven Tumorzellen von CLL-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen mindestens 80%) kultiviert und die Überstände anschließend mittels ELISA auf INF- γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

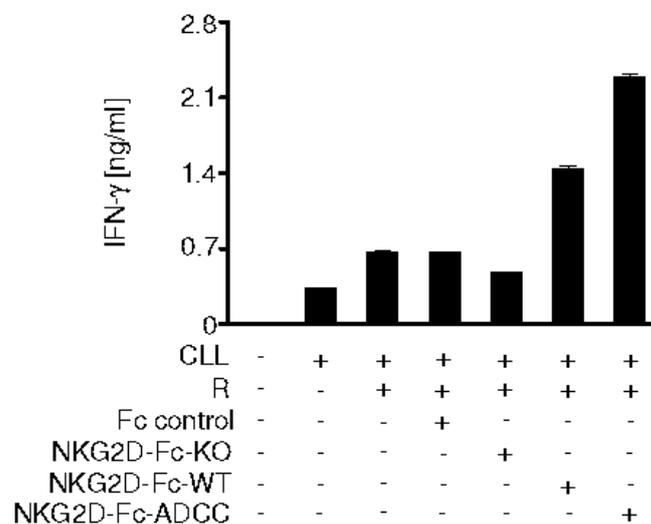


Abbildung 19: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit primären Leukämiezellen von CLL-Patienten in Gegenwart von Rituximab. Polyklonale NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert, in Anwesenheit von Rituximab (10 μ g/ml), für 24h mit NKG2DL-positiven Tumorzellen von CLL-Patienten (prozentualer Anteil maligner Zellen mindestens 80%) kultiviert und die Überstände anschließend mittels ELISA auf INF- γ untersucht. Abgebildet sind exemplarische Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Ähnlich den Ergebnissen, die bereits durch Experimente mit Transfektanten und Leukämiezelllinien erzielt wurden, wurde durch die Anwesenheit von primären Leukämiezellen allein bereits die Produktion von IFN- γ der NK-Zellen erhöht. Die Zytokinausschüttung der NK-Zellen wurde durch das NKG2D-Fc-ADCC gegen primäre AML- (Abbildung 17) sowie primäre CLL-Zellen (Abbildung 18) deutlich verstärkt. Ein dazu geringerer Anstieg konnte in Anwesenheit des NKG2D-Fc-WT erzielt werden, wohingegen NKG2D-Fc-KO zur Reduktion der IFN- γ Produktion führte.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der INF- γ Freisetzung der NK-Zellen gegen primäre CLL-Zellen in Anwesenheit von Rituximab. Wie in den Zytotoxizitätsuntersuchungen konnte auch hier gezeigt werden, dass die INF- γ Freisetzung auch in Gegenwart von Rituximab weiter verstärkt werden kann und die grundlegenden Effekte der verschiedenen NKG2D-Fc Fusionsproteine bestehen bleiben.

4.4.3 Induktion von Degranulation allogener NK-Zellen durch Behandlung mit NKG2D-Fc Fusionsproteinen in Kulturen mit primären Leukämiezellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Fusionsproteine auf die Degranulation von NK-Zellen in Kulturen mit primären Zellen von AML- und CLL-Patienten wurden die verschiedenen NKG2D-Fc-Fusionsproteine bzw. Isotypkontrolle zugegeben und die Expression von CD107a mittels FACS untersucht (Abbildung 20 und 21). Die Anfärbung allogener NK-Zellen erfolgte mit CD56⁺CD3⁻.

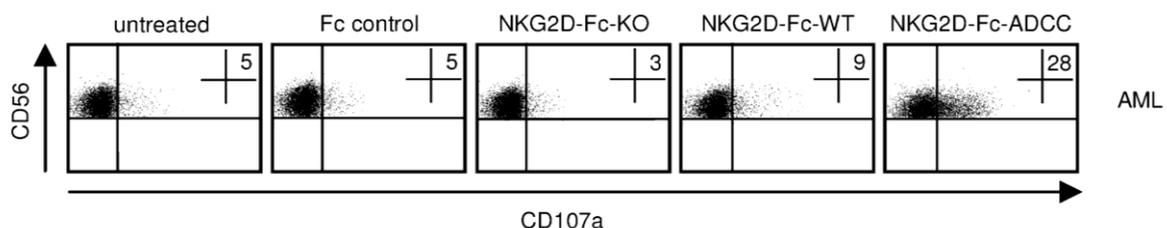


Abbildung 20: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-positiven Leukämiezellen von AML-Patienten. Allogene NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10 μ g/ml) inkubiert und für 3h mit primären NKG2DL-positiven Tumorzellen eines AML-Patienten kultiviert. Im Anschluss wurde die CD107a-Expression auf den NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻ bzw. NKp46⁺CD3⁻) mittels FACS bestimmt; der prozentuale Anteil ist jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Abgebildet sind beispielhafte Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Resultaten.

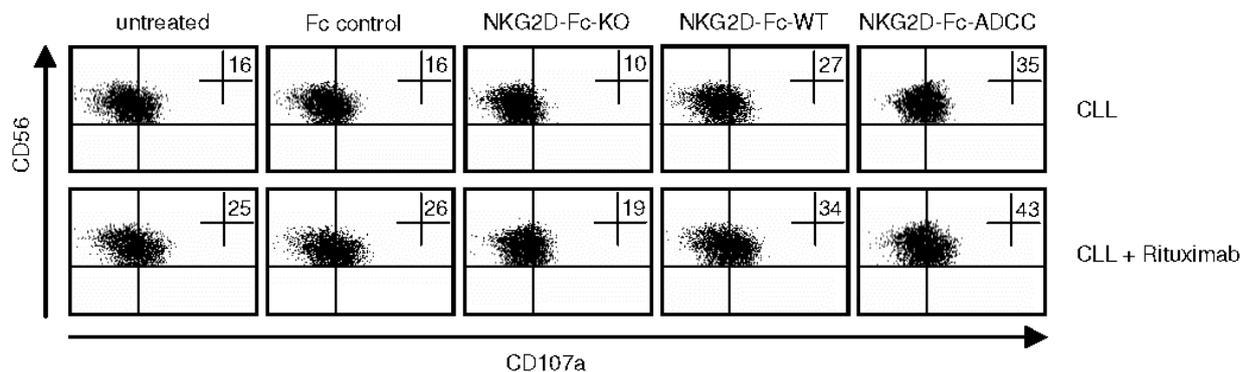


Abbildung 21: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-positiven Leukämiezellen von CLL-Patienten. Allogene NK-Zellen wurden mit NKG2D-Fc-Fusionsprotein bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) inkubiert, ohne bzw. mit Rituximab (10µg/ml) und für 3h mit primären NKG2DL-positiven Tumorzellen eines CLL-Patienten kultiviert. Im Anschluss wurde die CD107a-Expression auf den NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻) mittels FACS bestimmt; der prozentuale Anteil ist jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Abgebildet sind beispielhafte Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Resultaten.

Auch hier zeigte sich eine deutliche Induktion der Reaktivität von NK-Zellen gegen primäre maligne Zellen von AML- und CLL-Patienten durch das NKG2D-Fc-ADCC Fusionsprotein. Auch NKG2D-Fc-WT konnte die CD107a-Expression verstärken, wohingegen erneut eine Reduktion durch NKG2D-Fc-KO erzielt wurde. Auch in Gegenwart von Rituximab konnten die differentiellen Effekte der Fusionsproteine beobachtet werden (Abbildung 21).

4.5 Induktion von Degranulation autologer NK-Zellen durch die NKG2D-Fc Fusionsproteine

Um nun der Situation *in vivo* bei der Behandlung von Leukämiepatienten möglichst nahe zu kommen, analysierten wir den Einfluss der NKG2D-Fc Fusionsproteine auch auf die Reaktivität autologer NK-Zellen. Hierfür wurden PBMC von AML- und CLL-Patienten mit moderater Leukämiebelastung (40-75%) mit den NKG2D-Fc Fusionsproteinen inkubiert. Da die CD107a-Expression mit der NK-Zell-vermittelten Lyse korreliert, kann diese in Untersuchungen als Surrogatmarker für die Anti-Tumor-Reaktivität von NK-Zellen dienen, in denen ein Einsatz klassischer Zytotoxizitäts-Assays schwierig oder unmöglich ist. Deshalb ermöglicht die CD107a-Expressionsuntersuchung die Analyse der Reaktivität autologer NK-Zellen, die sich neben den malignen Zellen ebenfalls in den PBMC von AML- und CLL-Patienten finden.

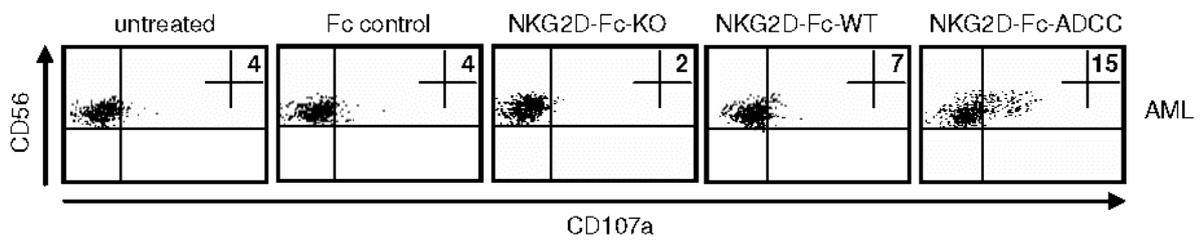


Abbildung 22: CD107a-Induktion auf autologen NK-Zellen von AML Patienten durch die Fusionsproteine. PBMC von AML-Patienten wurden mit den NKG2D-Fc Fusionsproteinen bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) für 3h inkubiert. Anschließend wurde die CD107a-Expression auf den autologen NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻ bzw. NKp46⁺CD3⁻) mittels FACS analysiert; der prozentuale Anteil CD107a-positiver Zellen ist jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Abgebildet sind beispielhafte Ergebnisse eines von 3 Versuchen mit vergleichbaren Resultaten.

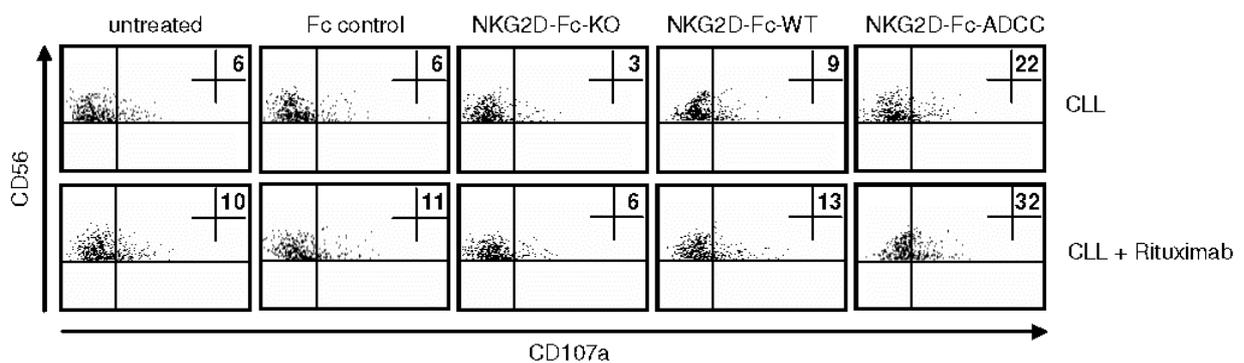


Abbildung 23: CD107a-Induktion auf autologen NK-Zellen von CLL Patienten durch die Fusionsproteine. PBMC von CLL-Patienten wurden mit den NKG2D-Fc Fusionsproteinen bzw. Isotyp-Kontrollen (je 10µg/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit von Rituximab für 3h inkubiert (10µg/ml). Anschließend wurde die CD107a-Expression auf den autologen NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻ bzw. NKp46⁺CD3⁻) mittels FACS analysiert; der prozentuale Anteil CD107a-positiver Zellen ist jeweils im rechten oberen Quadranten angegeben. Abgebildet sind beispielhafte Ergebnisse eines von je 3 Versuchen mit vergleichbaren Resultaten.

Wie in den Abbildungen 22 und 23 gezeigt und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem allogenen System wurde eine Steigerung der NK-Zell-Degranulation durch das WT-Fusionsprotein erzielt, die vom NKG2D-Fc-ADCC deutlich übertroffen wurde. Das NKG2D-Fc-KO wies auch im autologen System leicht inhibierende Effekte auf. Im Falle der CLL konnten die Effekte auch im autologen System sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Rituximab beobachtet werden (s. Abbildung 23)

5 Diskussion

Die Interaktion zwischen entarteten Zellen und dem Immunsystem entscheidet wesentlich darüber, ob die malignen Zellen eliminiert werden oder sich zu einer klinisch apparenten und lebensbedrohlichen Krankheit entwickeln. Krebserkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache in Industrienationen dar. Es wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, welche ein Versagen der Tumorimmunüberwachung verursachen. Der sogenannte *immune escape* wird heute auch als ein „*hallmark of cancer*“ angesehen.²⁸⁻³⁰

Bei der Immunüberwachung spielen verschiedene zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems eine Rolle. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die NK-Zellen, die im Besonderen bei der Immunüberwachung von malignen (hämatopoietischen) Erkrankungen eine bedeutende Rolle einnehmen.²⁶² NK-Zellen haben außerdem die Fähigkeit, an maligne Zellen gebundene Antikörper zu erkennen und daraufhin ADCC zu vermitteln. Auf dieser Eigenschaft beruht ganz wesentlich die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper wie zum Beispiel Rituximab.²³⁶ Bei der Interaktion von NK-Zellen mit malignen Zellen spielt neben einer ganzen Reihe anderer Moleküle das NKG2D/NKG2DL-Molekülsystem eine wichtige Rolle.^{135, 141, 187, 188, 189} Die stressinduzierten NKG2DL werden von Tumorzellen verschiedenster Tumorentitäten exprimiert.^{84, 132, 134, 86, 148, 149, 154} Auf gesunden Geweben sind diese Liganden jedoch im Allgemeinen nicht nachweisbar. Grundlage dieser Arbeit war die Rolle des NKG2D/NKG2DL-Molekülsystems bei Leukämiezellen, wobei die Eignung von NKG2DL als Zielmoleküle für eine therapeutische Induktion von ADCC durch NK-Zellen untersucht wurde.

Nachdem 2002 erstmals gezeigt wurde, dass nicht nur epitheliale Tumore, sondern auch Leukämiezellen NKG2DL exprimieren, bestätigten weitere Untersucher die Expression von NKG2DL auf Patientenzellen aller Leukämieentitäten (AML,^{180, 203, 263} ALL,^{264, 265} CLL,^{180, 204} und CML^{196, 201, 266}).

Monoklonale Antikörper kommen in der Krebstherapie seit mittlerweile mehr als einem Jahrzehnt erfolgreich zum Einsatz. Inzwischen ist bekannt, dass bei der Behandlung von malignen Erkrankungen mit tumorspezifischen Antikörpern wie zum Beispiel Rituximab²⁶⁸, anti-CD19²⁶⁹ und anti-CD40²⁷⁰ die Induktion von NK-Zell-Reaktivität von großer Bedeutung für deren Wirksamkeit ist. Von zentraler Relevanz ist dabei die Aktivierung des FcγRIIIA von NK-Zellen, wodurch ADCC und die Produktion von Zytokinen ausgelöst wird.^{228, 133} Allerdings sprechen einige Patienten überhaupt nicht, andere nur für eine limitierte Zeit auf eine Antikörpertherapie an, und für viele maligne Erkrankungen stehen bisher keine

immunstimulierenden Antikörper zur Verfügung. Aktuelle Bemühungen zielen deshalb darauf ab, die Induktion der NK-Zell-Effektorfunktionen und somit die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper durch Modifikation der Affinität des Fc-Teils von Antikörpern zu FcR zu optimieren.^{206, 269-272} und neue Zielantigene für Antitumorantikörper zu identifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass NKG2DL bei unterschiedlichen malignen Erkrankungen exprimiert sind, stellt das NKG2D/NKG2DL-Molekülsystem ein interessantes Ziel für therapeutische Ansätze dar.

Wir entwickelten hier eine therapeutische Strategie, die sich die tumor-restringierte Expression von NKG2DL zur Induktion von ADCC durch NK-Zellen zu Nutze macht. Hierfür generierten wir in Kooperation mit Dr. Grosse-Hovest aus der Abteilung Immunologie ein NKG2D-Fc Fusionsprotein bestehend aus dem extrazellulären Teil des NKG2D-Rezeptors und einem modifizierten humanen IgG Fc-Teil, der zu einer gesteigerten Affinität zum Fc-Rezeptor von NK-Zellen (SDIE-Modifikation) und somit zu einer verbesserten Induktion von NK-Zell-Reaktivität führen sollte (NKG2D-Fc-ADCC).²³⁷

Dieser Ansatz wurde aus folgenden Gründen gewählt: 1. Die Induktion von ADCC stellt einen zentralen Wirkmechanismus von Antitumor-Antikörpern dar.²⁵⁴ 2. Die Wirksamkeit von Strategien, die zu einer verbesserten Rekrutierung von Fc γ -exprimierenden Immunzellen durch Antikörper führen, ist klinisch belegt.²⁷¹ 3. NKG2DL sind selektiv auf Tumorzellen und auch auf leukämischen Zellen überexprimiert, einschließlich der myeloischen Entitäten, für welche bislang keine Antikörper zur Verfügung stehen.^{84, 274, 275} 4. Im Gegensatz zu spezifischen mAb, welche einen bestimmten NKG2DL erkennen, der nicht bei allen Patienten exprimiert wird, bindet unser NKG2D-Fc Fusionsprotein alle NKG2DL. 5. Die durch Bindung des Fusionsproteins unvermeidliche Reduktion der aktivierenden Signale via NKG2D sollte durch das hohe Potential des FC γ RIIIA (CD16), NK-Zellen zu stimulieren, mehr als kompensiert werden, vor allem bei Vorliegen eines modifizierten Fc-Teils. 6. NKG2D-Fc Fusionsproteine erlauben des Weiteren die Neutralisation der nachteiligen Effekte von löslichen NKG2DL auf die NKG2D-vermittelte Immunüberwachung in Tumorpatienten.¹¹⁵

Zur Einschätzung des Potentials der Fc-Optimierung und der Konsequenzen des Verlustes der aktivierenden Signale durch die Unterbrechung der NKG2D-NKG2DL Interaktion für die NK-Zell-Reaktivität wurden zwei weitere Fusionsproteine generiert und mit dem Fc-optimierten Molekül verglichen: das NKG2D-Fc-WT ohne Modifikationen im enthaltenenen IgG1 Fc-Teil und das NKG2D-Fc-KO, bei welchem die Affinität des IgG1 teils zum Fc-Rezeptor ausgeschaltet wurde.²⁷⁶

Alle drei NKG2D-Fc Fusionsproteine zeigten, unabhängig ihrer Unterschiede im Fc-Teil, eine vergleichbare und antigen-spezifische Bindung an NKG2DL. Dies konnte mittels

Durchflusszytometrie bei Transfektanten, Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen nachgewiesen werden. Die Analyse der Funktionalität der unterschiedlichen Fc-Teile hinsichtlich ihrer Affinität zum Fc-Rezeptor von NK-Zellen und der damit korrelierenden Fähigkeit zur Induktion von ADCC und Zytokinproduktion zeigte mit humanen NK-Zellen die erwarteten Ergebnisse: In Abwesenheit von Zielzellen (um den Einfluss anderer immunregulatorischer Moleküle auszuschließen) konnte nachgewiesen werden, dass das NKG2D-Fc-KO keine Stimulation der NK-Zellen induziert, während der Fc-Teil des NKG2D-Fc-WT sowohl eine Steigerung der Zytokinproduktion als auch des Aktivierungsstatus von NK-Zellen bewirkt. Die Stimulation von NK-Zellen durch den unmodifizierten Fc-Teil wurde deutlich durch die Effekte des ADCC-optimierten Fc-Teils (NKG2D-Fc-ADCC) übertroffen. Funktionelle Analysen von Zytotoxizität und Zytokinproduktion in Kokulturen von NK-Zellen und NKG2DL-Transfektanten zeigten mit NKG2D-Fc-KO, wie erwartet, eine Reduktion der NK-Zell-Reaktivität durch Blockade der aktivierenden NKG2D/NKG2DL-Interaktion. Die Gegenwart des NKG2D-Fc-WT führte dagegen bereits zu einer deutlichen Steigerung der NK-Zell-Reaktivität gegenüber den Zielzellen, die vom NKG2D-Fc-ADCC nochmals deutlich übertroffen wurde. Somit übertraf bereits die durch NKG2D-Fc-WT induzierte ADCC den Verlust der NKG2D/NKG2DL-vermittelten Signale, was mit dem hierarchisch organisierten Potential der aktivierenden NK-Rezeptoren im Einklang steht.^{133, 277} Mock-Transfektanten weisen eine geringere, aber durchaus relevante NKG2DL-Expression auf. So erfolgten die Effekte der verschiedenen Fusionsproteine auch mit mock-Transfektanten klar Zielantigen-restringiert, traten jedoch in deutlich geringerem Ausmaß auf, was die Abhängigkeit der Effekte der Fusionsproteine von der Expression der Zielantigene belegt.

Die Spezifität des Zielantigens stellt einen Kernpunkt hinsichtlich einer möglichen Toxizität im Falle einer Applikation im Menschen dar. NKG2DL sind auf der Oberfläche gesunder Zellen und Gewebe abwesend oder in geringen Leveln exprimiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass gegen diese keine ADCC induziert wird. Dennoch könnte die Behandlung mit unserem NKG2D-Fc-ADCC gegebenenfalls zur Lyse gesunder Zellen wie zum Beispiel gastrointestinaler Epithelzellen, von welchen berichtet wurde, dass sie eine NKG2DL-Expression aufweisen,^{148,151} führen. Allerdings werden hier die Level der NKG2DL-Expression, sowie die Expression vieler anderer immunregulatorischer Moleküle wie HLA Klasse I, entscheidend dafür sein, ob eine NK-Zell-Reaktivität gegen die gesunden Zellen induziert wird oder nicht. Auf jeden Fall dürften mögliche Nebenwirkungen nach Applikation unseres NKG2D-Fc-ADCC auch aufgrund seiner zu erwartenden Pharmakokinetik von temporärer Natur sein. Die Halbwertszeit eines anderen Immunrezeptor-Ig Fusionsproteins, dem klinisch zum Einsatz kommenden CTLA4-Ig im Serum zum Beispiel beträgt circa zwei Wochen.²⁷⁸ Lang anhaltende Nebenwirkungen einer Behandlung mit unserem NKG2D-Fc-

ADCC scheinen daher eher unwahrscheinlich. Andere Strategien hingegen, wie zum Beispiel chimäre NKG2D CAR-exprimierende T-Zellen,^{122, 279} könnten aufgrund der berichteten Persistenz und Expansion dieser T-Zellen in den behandelten Tumorpatienten lang anhaltende Nebenwirkungen verursachen.²⁸⁰

Nach der Charakterisierung mit Transfektanten und in Abwesenheit von Zielzellen wurde die Aktivität der Fusionsproteine in Analysen mit malignen Zellen evaluiert. Zunächst wurde dabei das Potential unserer NKG2D-Fc Fusionsproteine getestet, NK-Zell-Reaktivität gegen Leukämiezelllinien zu induzieren

Funktionelle Analysen mit Leukämiezelllinien aller Entitäten sowie primären AML- und CLL-Patientenzellen bestätigten die differentiellen Effekte unserer Konstrukte auf die NK-Zell-Reaktivität. NKG2D-Fc-ADCC stimulierte stets eine wirksame NK-Reaktivität gegen die Leukämiezellen, und die Effekte übertrafen in allen Fällen die des NKG2D-Fc-WT. Im Falle von CLL-Zellen wurden die Effekte der unterschiedlichen Fusionsproteine auch in Anwesenheit von Rituximab beobachtet, und die kombinierte Behandlung führte zu additiven Effekten. Da die therapeutischen Effekte von Rituximab wesentlich auf der Induktion von ADCC beruhen,²⁵⁴ geben diese vergleichenden Untersuchungen auch Aufschluss über das therapeutische Potential unserer Konstrukte und heben die Potenz der SDIE-Modifikation zur Induktion von ADCC hervor, vor allem wenn das Zielantigen wie z.B NKG2DL ein relativ niedriges Expressionsniveau aufweist, da ADCC-Effekte eines Antikörpers von der Oberflächenexpression seines Zielantigens abhängig sind.²⁸¹ Wohlgedenkt wurden die im allogenen System erhobenen Daten mit autologen NK-Zellen in PBMC von Leukämiepatienten bestätigt: Mit NKG2D-Fc-ADCC konnten im Vergleich zum NKG2D-Fc-WT stärkere Effekte beobachtet werden, die eine deutliche Reaktivität der autologen NK-Zellen ermöglichten. Das Ausmaß der Effekte unterschied sich dabei in Abhängigkeit vom Spender in allen Assaysystemen mit Leukämiezellen erheblich. Dies unterstreicht die allgemeine Ansicht, dass die NK-Zell-Reaktivität durch die Balance aus vielen verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Signalen, die zwischen den individuellen Patienten und/oder experimentellen Settings variieren, bestimmt wird.²⁸² Variierende NKG2DL-Expressionsmuster auf den Leukämiezellen und der F158V-Polymorphismus des Fc γ R1IIa, welche die ADCC allogener und autologer NK-Zellen beeinflussen, in unseren Analysen jedoch nicht berücksichtigt wurden, könnten zu der beobachteten Variabilität der Effekte beigetragen haben.^{84, 231, 275}

Zusammengenommen zeigen unsere Ergebnisse das Potential einer therapeutischen Strategie, mittels Fc-optimierten NKG2D-Fc Fusionsproteins ADCC von NK-Zellen gegen maligne Zellen zu induzieren. Die immunstimulierende Wirkung unseres Fusionsproteins NKG2D-Fc-ADCC könnte zukünftig eine klinische Relevanz vor allem in Situationen haben,

in denen die Fähigkeit von NK-Zellen zu ADCC beeinträchtigt ist, so zum Beispiel während immunsuppressiver Behandlung nach SCT bei AML oder für NK-Zell ADCC bei CLL.^{59, 100, 102, 259, 261, 283, 284}

6 Literaturverzeichnis

1. Baltz-Ghahremanpour KM. Rolle von Glucocorticoid-Induced TNFR Related (GITR) Protein bei der Interaktion von NK Zellen und Tumorzellen im Menschen. *Dissertation, Eberhard Karls University of Tübingen, Germany 2008.*
2. Baessler T. Rolle von Glucocorticoid-Induced TNFR Related Protein (GITR) Ligand und 4-1BB Ligand bei der Immunüberwachung von Tumoren durch NK-Zellen. *Dissertation, Eberhard Karls University of Tübingen, Germany 2008.*
3. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
4. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990; 172:1785-1794.
5. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
6. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med* 1999; 190:1909-1914.
7. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302:575-581.
8. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; 8:3-26.
9. Tonegawa S. Antibody and T-cell receptors. *JAMA* 1988; 259:1845-1847.
10. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334:395-402.
11. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-548.
12. O'Rourke AM, Mescher MF. Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events. *Nature* 1992; 358:253-255.
13. Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:447-452.
14. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-793.
15. Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 1993; 5:413-420.
16. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5:273-290.

17. Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. New York: Hoeber-Harper; 1959.
18. Burnet FM. Cancer- a biological approach. Br Med J. 1957; 1:841-847
19. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. Science. 1974;183:534-536.
20. Stutman O. Immunodepression and malignancy. Adv Cancer Res. 1975;22:261-422
21. Dighe AS, Richard E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. Immunity. 1994; 1:447-456
22. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:7556-7561.
23. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. Nature. 2001; 410:1107-1111.
24. Prehn RT, Main JM, Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J Natl Cancer Inst. 1957; 18:769-778.
25. Itoh K, Platsoucas CD, Tilden AB, Pollock RE, Balch CM. Lysis of fresh solid tumor targets in the presence of Con A is mediated primarily by Leu 7+ peripheral blood T lymphocytes: blocking by the anti-CD3 monoclonal antibody and comparison with recombinant interleukin 2-induced lysis by natural killer cells. Cell Immunol. 1987;108:283-296.
26. Nishimura MI, Avichezer D, Custer MC et al. MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4+ tumor infiltrating lymphocyte. Cancer Res. 1999;59:6230-6238.
27. Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. J Immunol. 1989;142:3714-3725.
28. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006;6:715-727
29. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004;21:137-148.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646-674.
31. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. J Immunother. 1997;20:165-177.
32. Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. Immunol Today. 1993;14:483-486.
33. Evans DE, Weinberg AD. Boosting T cell costimulation in cancer: the possibilities seem endless. Int Rev Immunol. 2003;22:173-194.

34. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003;192:161-180.
35. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1991;147:4398-4401.
36. Dummer W, Bastian BC, Ernst N et al. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer.* 1996;66:607-610.
37. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010;31:220-227..
38. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM et al. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer.* 1993;55:96-101.
39. Huang M, Wang J, Lee P et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* 1995;55:3847-3853.
40. Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer.* 1994;70:1182-1185.
41. Gotlieb WH, Abrams JS, Watson JM et al. Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokine.* 1992;4:385-390.
42. Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol.* 1999;16:86-94.
43. Matsuda M, Salazar F, Petersson M et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med.* 1994;180:2371-2376.
44. Salazar-Onfray F, Lopez MN, Mendoza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:171-182.
45. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011;7:651-658.
46. Yoon SJ, Heo DS, Kang SH et al. Natural killer cell activity depression in peripheral blood and ascites from gastric cancer patients with high TGF-beta(1) expression. *Anticancer Research.* 1998;18:1591-1596.
47. de Baetselier P, Katzav S, Gorelik E, Feldman M, Segal S. Differential expression of H-2 gene products in tumour cells in associated with their metastatogenic properties. *Nature.* 1980;288:179-181.
48. Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature.* 1976;261:705-707.

49. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997;18:89-95.
50. Hui K, Grosveld F, Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature*. 1984;311:750-752.
51. Ogino T, Shigyo H, Ishii H et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res*. 2006;66:9281-9289.
52. Kitamura H, Honma I, Torigoe T et al. Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 2007;177:1269-1272.
53. Rolland P, Deen S, Scott I, Durrant L, Spendlove I. Human leukocyte antigen class I antigen expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3591-3596.
54. Bijen CB, Bantema-Joppe EJ, de Jong RA et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2010;126:1417-1427.
55. Mizukami Y, Kono K, Maruyama T et al. Downregulation of HLA Class I molecules in the tumour is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2008;99:1462-1467.
56. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4751-4755.
57. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*. 2001;83:117-158.
58. Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem*. 2010;285:8543-8551.
59. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res*. 2009;69:1037-1045.
60. Baltz KM, Krusch M, Baessler T et al. Neutralization of tumor-derived soluble glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand increases NK cell anti-tumor reactivity. *Blood*. 2008;112:3735-3743.
61. Salih HR, Schmetzer HM, Burke C et al. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol*. 2001;167:4059-4066.
62. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity*. 2000;13:303-312.

63. Schneider P, Holler N, Bodmer JL et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205-1213.
64. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:745-756.
65. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419:734-738.
66. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8:793-800.
67. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003;170:1257-1266.
68. Strome SE, Dong H, Tamura H et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:6501-6505.
69. Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M et al. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.* 2003;63:7462-7467.
70. Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood.* 2004;104:2124-2133.
71. Chen X, Liu S, Wang L et al. Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:622-627.
72. Blank C, Kuball J, Voelkl S et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer.* 2006;119:317-327.
73. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5:112-117.
74. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-121.
75. Herberman RB, Djeu JY, Ortaldo JR, Holden HT, West WH, Bonnard GD. Role of interferon in augmentation of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978; 62:1893-1896.
76. Yoon SR, Chung JW, Choi I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells* 2007; 24:1-8.
77. Moretta L, Biassoni R, Botino C, Cantoni C, Pende D, Minagari MC et al. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002; 4: 1539-1544
78. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-274.

79. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:329-339.
80. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004;23:255-259
81. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20:123-137.
82. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:613-635.
83. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1:387-391.
84. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-1396.
85. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2001; 2:443-451.
86. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001; 53:279-287.
87. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-848.
88. Hayakawa Y, Smyth MJ. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res* 2006; 95:293-322.
89. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:169-183.
90. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
91. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:359-393.
92. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:308-314.
93. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:875-904.
94. Moretta L, Mingari MC, Pende D et al. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol*. 1996;16:243-253.
95. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev*. 1997;155:135-144.

96. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391:795-799.
97. Chapman TL, Heikema AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11:603-613.
98. Baltz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P et al. Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interaction. *FASEB J*. 2007. 21: 2442-2454
99. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ, Kloss M, Baltz KM, Wacker A et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res* 2009; 69:1037-1045.
100. Buechele C, Baessler T, Wirths S, et al. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2011;26:991-1000.
101. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grunebach F, Krusch M, Wacker A et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2010; 115:3058-3069.
102. Buechele C, Baessler T, Schmiedel BJ, et al. 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 2012;42:737-48.
103. Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R et al. Identification of 41g-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:12640-12645.
104. Avril T, Floyd H, Lopez F, Vivier E, Crocker PR. The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by siglecs-7 and-9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *Journal of Immunology*. 2004;173:6841-6849.
105. Cantoni C, Bottino C, Augugliaro R et al. Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *European Journal of Immunology*. 1999;29:3148-3159.
106. Vitale M, Bottino C, Sivori S et al. 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*. 1998;187:2065-2072.
107. Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
108. Brandt CS, Baratin M, Yi EC et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206:1495-1503.

109. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M et al. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*. 2013;122:2935-2942.
110. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*. 2005;202:1001-1012.
111. Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun*. 2011;3:216-226.
112. Biassoni R, Cantoni C, Pende D et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*. 2001;181:203-214.
113. Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM et al. The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med*. 1996;184:2119-2128.
114. Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*. 2006;7:1334-1342.
115. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:291-330.
116. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:781-790.
117. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *Journal of Immunology*. 1996;157:4741-4745.
118. Li PW, Morris DL, Willcox BE et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology*. 2001;2:443-451.
119. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J et al. Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2:255-260.
120. Long EO. Versatile signaling through NKG2D. *Nature Immunology*. 2002;3:1119-1120.
121. Groh V, Bruhl A, El Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:9452-9457.
122. Zhang T, Barber A, Sentman CL. Chimeric NKG2D modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways. *Cancer Res*. 2007;67:11029-11036.
123. Castriconi R, Cantoni C, Della CM et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4120-4125.

124. Friese MA, Wischhusen J, Wick W et al. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res.* 2004;64:7596-7603.
125. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M et al. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunologic Research.* 2008;40:18-34.
126. Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E et al. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood.* 2005;106:1711-1717.
127. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U et al. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol.* 2005;175:720-729.
128. Wu J, Song Y, Bakker AB et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 1999;285:730-732.
129. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol.* 2003;4:557-564.
130. Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA et al. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nature Immunology.* 2006;7:524-532.
131. Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M et al. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol.* 2002;3:1142-1149.
132. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 2001;14:123-133.
133. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006;107:159-166.
134. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev.* 2010;235:267-285.
135. Bauer S, Groh V, Wu J et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285:727-729.
136. Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Current Opinion in Immunology.* 2005;17:505-509.
137. Radaev S, Rostro B, Brooks AG, Colonna M, Sun PD. Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity.* 2001;15:1039-1049.
138. Radaev S, Sun PD. Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 2003;32:93-114.

139. Steinle A, Li P, Morris DL et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001;53:279-287.
140. Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ et al. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics*. 2002;79:114-123.
141. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*. 2000;12:721-727.
142. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol*. 2002;169:4079-4083.
143. Fernandez-Messina L, Ashiru O, Aguera-Gonzalez S, Reyburn HT, Vales-Gomez M. The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. *Journal of Cell Science*. 2011;124:321-327.
144. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol*. 2000;1:119-126.
145. Strong RK, McFarland BJ. NKG2D and related immunoreceptors. *Cell Surface Receptors*. 2004;68:281-+.
146. Fernandez-Messina L, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol*. 2012;3:299.
147. Kriegeskorte AK, Gebhardt FE, Porcellini S et al. NKG2D-independent suppression of T cell proliferation by H60 and MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:11805-11810.
148. Groh V, Bahram S, Bauer S et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12445-12450.
149. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279:1737-1740.
150. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436:1186-1190.
151. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:737-744.
152. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng WW, Jung HY. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annual Review of Immunology, Vol 31*. 2013;31:413-441.
153. Salih HR, Antropius H, Gieseke F et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. 2003;102:1389-1396.

154. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene*. 2008;27:5944-5958.
155. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21:367-377.
156. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilia J, Bahram S. In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *Plos One*. 2007;2.
157. Gomes AQ, Correia DV, Silva-Santos B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *Embo Reports*. 2007;8:1024-1030.
158. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2006;291:L222-L231.
159. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun*. 2013;13:8.
160. Jinushi M, Takehara T, Kanto T et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2003;170:1249-1256.
161. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol*. 2004;172:2001-2005.
162. Ebihara T, Masuda H, Akazawa T et al. Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol*. 2007;19:1145-1155.
163. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood*. 2007;109:3776-3785.
164. Kloss M, Decker P, Baltz KM et al. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol*. 2008;181:6711-6719.
165. Schrama D, Terheyden P, Otto K et al. Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:65-72.
166. Wang H, Ruan Z, Wang Y et al. MHC class I chain-related molecules induced on monocytes by IFN-gamma promote NK cell activation. *Mol Immunol*. 2008;45:1548-1556.
167. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev*. 2009;5:22-34.
168. Schulz U, Kreutz M, Multhoff G et al. Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand J Immunol*. 2010;72:319-331.

169. Molinero LL, Fuertes MB, Fainboim L, Rabinovich GA, Zwirner NW. Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73:815-822.
170. Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV et al. NF- κ B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 2004;173:5583-5590.
171. Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. Cutting edge: NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8(+) T cells. *Journal of Immunology*. 2005;174:4480-4484.
172. Molinero LL, Domaica CI, Fuertes MB et al. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Human Immunology*. 2006;67:170-182.
173. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M et al. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood*. 2007;110:606-615.
174. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M et al. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nature Immunology*. 2008;9:1065-1073.
175. Eissmann P, Evans JH, Mehrabi M et al. Multiple Mechanisms Downstream of TLR-4 Stimulation Allow Expression of NKG2D Ligands To Facilitate Macrophage/NK Cell Crosstalk. *Journal of Immunology*. 2010;184:6901-6909.
176. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S et al. Tumor Suppressive MicroRNAs miR-34a/c Control Cancer Cell Expression of ULBP2, a Stress-Induced Ligand of the Natural Killer Cell Receptor NKG2D. *Cancer Research*. 2012;72:460-471.
177. Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res*. 2005;65:6321-6329.
178. Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res*. 2007;31:1393-1402.
179. Tang KF, He CX, Zeng GL et al. Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370:578-583.
180. Poggi A, Catellani S, Garuti A et al. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia*. 2009;23:641-648.
181. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K et al. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Oncology Reports*. 2010;24:1621-1627.

182. Schmiedel BJ, Arelin V, Gruenebach F et al. Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer*. 2011;128:2911-2922.
183. Wu XS, Tao Y, Hou J, Meng XQ, Shi JM. Valproic Acid Upregulates NKG2D Ligand Expression through an ERK-dependent Mechanism and Potentially Enhances NK Cell-mediated Lysis of Myeloma. *Neoplasia*. 2012;14:1178-1189.
184. Jensen H, Hagemann-Jensen M, Lauridsen F, Skov S. Regulation of NKG2D-ligand cell surface expression by intracellular calcium after HDAC-inhibitor treatment. *Molecular Immunology*. 2013;53:255-264.
185. Armeanu S, Krusch M, Baltz KM et al. Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3520-3528.
186. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. 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*. 2001;98:11521-11526.
187. Pende D, Rivera P, Marcenaro S et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res*. 2002;62:6178-6186.
188. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002;17:19-29.
189. Guerra N, Tan YX, Joncker NT et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008;28:571-580.
190. Bryceson YT, Ljunggren HG. Tumor cell recognition by the NK cell activating receptor NKG2D. *Eur J Immunol*. 2008;38:2957-2961.
191. Ljunggren HG. Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover. *Immunity*. 2008;28:492-494.
192. Salih HR, Nussler V. Commentary: Immune escape versus tumor tolerance: how do tumors evade immune surveillance? *Eur J Med Res*. 2001;6:323-332.
193. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*. 2002;169:4098-4102.
194. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E et al. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *Journal of Immunology*. 2003;171:6891-6899.
195. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al. 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. *Journal of Hepatology*. 2005;43:1013-1020.

196. Boissel N, Rea D, Tieng V et al. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol.* 2006;176:5108-5116.
197. Marten A, Lilienfeld-Toal M, Buchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gamma delta T cell cytotoxicity. *International Journal of Cancer.* 2006;119:2359-2365.
198. Jinushi M, Hodi FS, Dranoff G. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103:9190-9195.
199. Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol.* 2006;67:188-195.
200. Salih HR, Holdenrieder S, Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci.* 2008;13:3448-3456.
201. Sconocchia G, Lau M, Provenzano M et al. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. *Blood.* 2005;106:3666-3672.
202. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.* 2006;66:2520-2526.
203. Diermayr S, Himmelreich H, Durovic B et al. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood.* 2008;111:1428-1436.
204. Nuckel H, Switala M, Sellmann L et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2010;24:1152-1159.
205. Bacon L, Eagle RA, Meyer M et al. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol.* 2004;173:1078-1084.
206. Cao W, Xi X, Hao Z et al. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2007;282:18922-18928.
207. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Research.* 2008;68:6368-6376.
208. Clayton A, Mitchell JP, Court J et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol.* 2008;180:7249-7258.
209. Boutet P, Agura-Gonzalez S, Atkinson S et al. Cutting Edge: The Metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-Converting Enzyme Regulates Proteolytic Shedding of the MHC Class I-Related Chain B Protein. *Journal of Immunology.* 2009;182:49-53.
210. Liu G, Atteridge CL, Wang XJ, Lundgren AD, Wu JD. Cutting Edge: The Membrane Type Matrix Metalloproteinase MMP14 Mediates Constitutive Shedding of MHC Class

- I Chain-Related Molecule A Independent of A Disintegrin and Metalloproteinases. *Journal of Immunology*. 2010;184:3346-3350.
211. Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L et al. Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Research*. 2010;70:481-489.
 212. Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells. *Plos One*. 2011;6.
 213. Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol*. 2006;239:22-30.
 214. Cerboni C, Ardolino M, Santoni A, Zingoni A. Detuning CD8(+) T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood*. 2009;113:2955-2964.
 215. Ma L, Li G, Su Y et al. The soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma. *J Clin Neurosci*. 2010;17:241-247.
 216. Della CM, Carlomagno S, Frumento G et al. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*. 2006;108:4118-4125.
 217. Crane CA, Han SJ, Barry JJ et al. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8(+) T cells glioma patients. *Neuro-Oncology*. 2010;12:7-13.
 218. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013;78:120-129.
 219. Konjevic G, Martinovic KM, Vuletic A et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2007;24:1-11.
 220. Osaki T, Saito H, Yoshikawa T et al. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:382-387.
 221. van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993; 14:215-221.
 222. Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Bonnin E, Menez R, Stura E et al. Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett* 2006; 106:111-118.
 223. Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2005; 25:1-18.

224. Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol* 2001; 309:737-749.
225. Brekke OH, Michaelsen TE, Sandlie I. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* 1995; 16:85-90.
226. Mimura Y, Ghirlando R, Sondermann P, Lund J, Jefferis R. The molecular specificity of IgG-Fc interactions with Fc gamma receptors. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495:49-53.
227. Kurosaki T, Ravetch JV. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII. *Nature* 1989; 342:805-807.
228. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
229. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; 107:159-166.
230. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, de Vries E, Simsek S, van Tol MJ et al. A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J Immunol* 1996; 156:2948-2955.
231. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, de Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997; 90:1109-1114.
232. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K et al. A novel polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1059-1070.
233. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood* 2002; 99:754-758.
234. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001; 276:6591-6604.
235. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277:26733-26740.
236. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104:2635-2642.
237. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4005-4010.

238. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:345-352.
239. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*. 2005;128:18-34.
240. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56:344-350.
241. Giles FJ, Keating A, Goldstone AH et al. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002;73-110.
242. Dombret H, Raffoux E, Gardin C. Acute myeloid leukemia in the elderly. *Semin Oncol*. 2008;35:430-438.
243. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.
244. Crowther D, Bateman CJT, Vartan CP et al. Combination Chemotherapy Using L-Asparaginase, Daunorubicin, and Cytosine Arabinoside in Adults with Acute Myelogenous Leukaemia. *British Medical Journal*. 1970;4:513-&.
245. Clarkson BD. Acute Myelocytic Leukemia in Adults. *Cancer*. 1972;30:1572-1582.
246. Powles RL, Crowther D, Bateman CJT et al. Immunotherapy for Acute Myelogenous Leukemia. *British Journal of Cancer*. 1973;28:365-376.
247. Baccarani M, Saglio G, Goldman J et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-1820.
248. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370:342-350.
249. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: Incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26:3358-3363.
250. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995;333:1052-1057.
251. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompandium Internistische Onkologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 2006.
252. Hallek M, Pflug N. Chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii154-vii164.
253. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164-1174.
254. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol*. 2010;47:115-123.

255. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104:2635-2642.
256. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1561-1570.
257. Nasrallah AG, Miale TD. Decreased Natural-Killer Cell-Activity in Children with Untreated Acute-Leukemia. *Cancer Research*. 1983;43:5580-5585.
258. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2008;40:84-90.
259. Tajima F, Kawatani T, Endo A, Kawasaki H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia*. 1996;10:478-482.
260. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood*. 1996;88:2279-2287.
261. Lowdell MW, Craston R, Samuel D et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol*. 2002;117:821-827.
262. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271.
263. Sanchez-Correa B, Morgado S, Gayoso I et al. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2011;160:1195-1205.
264. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of the freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: Evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005;105:2066-73.
265. Kato N, Tanaka J, Sugita J et al. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*. 2007;21:2103-08.
266. Salih J, Hilpert J, Placke T, et al. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int. J Cancer*. 2010;127:2119-28.
267. Nowbakht P, Inoescu MCS, Rohner A et al. Ligands for the natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*. 2005;105:3615-22.
268. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory R_c receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2006;6:443-446.

269. Horton HM, Bennett MJ, Pong E et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res.*2008;68:8049-57.
270. Horton HM, Bennett MJ, Peipp M et al. Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent in vitro and in vivo antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood.*2010;116:3004-12.
271. Owen C, Stewart DA. Obinutuzumab for the treatment of lymphoproliferative disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy.*2012;12:343-351.
272. Foyil KV, Bartlett NL. Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2010;5:140-147.
273. Prochazka V, Papajik T, Gazdova J et al. Fc gamma RIIIA receptor genotype does not influence an outcome in patients with follicular lymphoma treated with risk-adapted immunochemotherapy. *Neoplasma.*2011;58:263-270.
274. Feldman EJ, Brandwein J, Stone R et al. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23:4110-116.
275. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grunebach F et al. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol.* 2012 189:1360-71.
276. Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *European Journal of Immunology.* 1999;29:2613-24.
277. Bryceson YT, Ljunggren HG, Long EO. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood.* 2009;114:2657-2666.
278. Ma Y, Lin BR, Lin B et al. Pharmacokinetics of CTLA4Ig fusion protein in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2009;30:364-371.
279. Zhang T, Barber A, Sentman CL. Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with chimeric NKG2D receptor. *Cancer Res.* 2006;66:5927-33.
280. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:525-541.
281. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-290.
282. Vivier E, Raulet DH, Moretta A et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011; 331:44-49.
283. Jaglowski SM, Alinari L, Lapalombella R et al. The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2010;17:6287-97.

-
284. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME et al. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin. Cancer Res* 2011;17:6287-97.
 285. Deng W, Gowen BG, Zhang L, Wang L et al. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science*. 2015; 3: 136-9.
 286. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE et al. idelalisib and Rituximab in relapsed CLL. *N Engl J Med*. 2014; 13: 997-1007.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9)</i>
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AICL	<i>activation induced C-type lectin</i>
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRA	<i>all-trans-retinoic acid</i>
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region-Abelson-Tyrosinkinase</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation; cluster of determinants</i>
CD95L	CD95 Ligand
CFU	<i>colony-forming unit</i>
clgM	zytoplasmatische IgM-Schwerketten
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplette Remission (<i>complete remission</i>)
CTLR	C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren
CXCL	<i>CXC chemokine ligand</i>
DAP10	<i>DNAX activation protein of 10kDa</i>
DAP12	<i>DNAX activation protein of 12kDa</i>
DCs	<i>dendritic cells</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAM-1	<i>DNAX accessory molecule-1</i>
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fas	<i>factor of apoptosis</i>
FasL	Fas Ligand
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	<i>Figure</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF related protein</i>
G(M)-CSF	<i>granulocyte (macrophage) colony-stimulating factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTPasen	Guanosinetriphosphatasen
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvL	<i>Graft versus Leukemia</i>
h	Stunden (<i>hours</i>)
Hb	Hämoglobin
HDAC	Histon-Deacetylase(n)
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSP	Hitzeschockproteine (<i>heat shock proteins</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
i.v.	intravenös
KDa	Kilodalton
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KM	Knochenmark
KO	<i>knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade

MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA/B	<i>MHC class I related chain A/B</i>
MIP-1 α/β	<i>macrophage inflammatory protein-1 α/β</i>
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRD	<i>minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MULT1	<i>murine UL16-binding protein-like transcript1</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NKC	<i>Natural killer complex</i>
NKG2	<i>natural killer group 2</i>
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
NKG2DL	NKG2D-Ligand(en)
NKp	<i>natural killer protein</i>
NKT	Natürliche Killer T
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD/SCID	<i>nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tmWjl} /Sz, NOD/SCID/IL2R γ ^{null}
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PD-(L)1	<i>programmed death (ligand) 1</i>
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PRR	<i>pattern recognition receptor(s)</i>
RAE	<i>retinoic acid early-inducible gene</i>
RAET	<i>retinoic acid early transcript</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
SCID	<i>severe combined immune-deficient</i>
SDIE	S239D/I332E
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
slg	zytoplasmatische oder oberflächliche Leichtketten
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing-protein tyrosine phosphatase</i>

sNKG2DL	lösliche NKG2DL (<i>soluble NKG2DL</i>)
Src	<i>sarcoma</i>
SCT	Stammzelltransplantation (<i>stem cell transplantation</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T Helfer
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor(en)
TLR	<i>Toll-like receptor(s)</i>
TM	Transmembranprotein
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	TNF-Rezeptor
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
TSA	Trichostatin
TSZ	Tumorstammzellen
ULBP	<i>UL16-binding protein(s)</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WBC	<i>white blood count</i>
WHO	<i>world health organization</i>
WT	Wildtyp
XCL1	<i>Chemokine (C motif) ligand 1</i>

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Humane und murine NKG2DL.....	17
Tab. 2: French-American-British- (FAB-) Klassifikation der AML.	24
Tab. 3: Antigenexpression bei der akuten myeloischen Leukämie.....	25
Tab. 4: WHO-Klassifikation der AML.	27
Tab. 5: Antigenexpression bei der B-ALL.	28
Tab. 6: Antigenexpression bei der B-ALL.	29
Tab. 7: Kriterien der akzelerierten Phase und Blastenkrise der CML.	30
Tab. 8: Stadieneinteilung der CLL nach Rai (1975).	32
Tab. 9: Stadieneinteilung der CLL nach Binet.....	33

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Unterteilung der Komponenten des Immunsystems.....	6
Abb. 2: Schematische Darstellung des NKG2D-Fc Fusionsproteins..	49
Abb. 3: Nachweis der Bindungsspezifität der NKG2D-Fc Fusionsproteine an Transfektanten..	49
Abb. 4: Nachweis der Bindungsspezifität der NKG2D-Fc Fusionsproteine an NKG2DL-tragende Zelllinien..	50
Abb. 5: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an primäre Tumorzellen..	51
Abb. 6: Nachweis der Bindung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an polyklonale NK-Zellen.	51
Abb. 7: Funktionelle Charakterisierung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an polyklonale NK-Zellen.	52
Abb. 8: Funktionelle Charakterisierung der NKG2D-Fc Fusionsproteine an polyklonale NK-Zellen.	53
Abb. 9: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen Transfektanten.....	54
Abb. 10: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine gegen Transfektanten.....	55
Abb. 11: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen NKG2DL-tragenden Zelllinien.	56
Abb. 12: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine gegen NKG2DL-tragenden Zelllinien.	57
Abb. 13: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-tragenden Zelllinien aller vier Leukämieentitäten.....	58
Abb. 14: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre AML-Leukämiezellen.	59
Abb. 15: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre CLL-Leukämiezellen.	60
Abb. 16: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D-Fc Fusionsproteine gegen primäre CLL-Leukämiezellen und Rituximab (R).....	60
Abb. 17: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine gegen primäre Leukämiezellen von AML-Patienten.....	61
Abb. 18: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine gegen primäre Leukämiezellen von CLL-Patienten.....	62

Abb. 19: Modulation der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch die Fusionsproteine gegen primäre Leukämiezellen von CLL-Patienten und Rituximab.	62
Abb. 20: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-positiven Tumorzellen von AML-Patienten.....	63
Abb. 21: CD107a-Induktion bei NK-Zellen durch die Fusionsproteine in Kulturen mit NKG2DL-positiven Tumorzellen von CLL-Patienten.	64
Abb. 22: CD107a-Induktion auf autologen NK-Zellen durch die Fusionsproteine.	65
Abb. 23: CD107a-Induktion auf autologen NK-Zellen durch die Fusionsproteine.	65

7.4 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum der Eberhard-Karls Universität Tübingen in der Medizinischen Klinik II, Abteilung Hämatologie/Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. H.R. Salih durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung von Julia Steinbacher und Tina Nübling von mir eigenständig durchgeführt.

Die für die Experimente dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine wurden von Dr. Grosse-Hovest aus der Abteilung Immunologie der Eberhard-Karls Universität Tübingen hergestellt.

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

Stuttgart, den 25.10.2015

7.5 Danksagung

Herrn Professor Dr. Helmut R. Salih danke ich von ganzem Herzen. Nicht nur für die Ermöglichung, die intensive Unterstützung und Förderung dieser und der letzten wissenschaftlichen Arbeit, für die zahlreichen Anregungen und die wunderschönen Kongresse, sondern vor allem für seine Begleitung meines Lebens nun schon über zehn Jahre. Allein wäre ich oft verzweifelt und nicht weitergekommen. Ein Dank auch von ganzem Herzen ist hier nicht genug.

Herrn Professor Dr. Lothar Kanz danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion an der medizinischen Klinik II (Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Immunologie und Pulmologie) durchführen zu können.

Meiner Betreuerin Julia Steinbacher sei für die stetige Hilfsbereitschaft gedankt.

Fragen, die zu beantworten viel Mühe und vor allem Geduld kosteten, wurden und werden von mir an Frau Dr. Tina Nübling gestellt. Für ihren bewundernswerten Langmut ein aufrichtiges Danke. Danke für das Interesse, nicht nur an meiner Arbeit und das Gefühl willkommen zu sein.

Dank allen weiteren inzwischen teilweise schon ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Die Erinnerung an Benjamin, Julia, Carolin, Karla, Guido, Benedikt und Ingrid ist mir so lieb geworden. Ich denke oft und gern daran zurück.

Besonderer Dank gilt Frau Elisabeth Frahne für das gemeinsame Erleben von Höhen und Tiefen, das größte Verständnis in Prüfungszeiten, einfach die tiefe Freundschaft über all die Jahre und oft auch das Aufzeigen einer anderen Sichtweise.

Viele meiner Tränen getrocknet, immer eine Hand zum Aufhelfen und Geleiten, einfach jederzeit für mich da. Ich denke, mein Mann Mehran weiß, wieviel er mir bedeutet, ohne ihn wäre vieles, unter anderem das Zweitstudium und diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ein Danke an meine lieben, geduldigen Kinder, Marie und Nikolas für ihr Lachen in schwersten Zeiten. Meine Welt ist bunt seit es Euch gibt.

Alles was ich bin und machen konnte, verdanke ich meinen Eltern und meinem Bruder Florian, auch der größte Dank ist hier nichtig. Ich denke, sie wissen, dass wir auf immer verbunden sind.

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Katrin Miriam Baltz-Ghahremanpour, geb. Baltz

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

Auszeichnungen:

- 2005 Posterpreis auf dem IZKF-Kolloquium 2005 der Med. Fakultät Tübingen
- 2005 Travel Award auf dem jährlichen Kongress der „American Society of
Hematology“ 2005 in Atlanta, USA
- 2006 Vortragspreis auf dem IZKF-Kolloquium 2006 der Med. Fakultät Tübingen
- 2007 Travel Award auf dem jährlichen Kongress der „American Society of
Hematology“ 2007 in Atlanta, USA

7.7 Eigene Publikationen

1. Baltz KM*, Krusch M*, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, Baessler T, Kumbier I, Peterfi A, Kupka S, Menzel S, Radsak MP, Rammensee HG, and Salih HR: Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interaction. *FASEB J.* 2007. 21: 2442-2454
2. Zara V, Ferramosca A, Capobianco L, Baltz KM, Randel O, Rassow J, Palmieri F, Papatheodorou P: Biogenesis of yeast dicarboxylate carrier: the carrier signature facilitates translocation across the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Sci.* 2007. 120: 4099-4106
3. Rittig K, Peter A, Baltz KM, Tschritter O, Weigert C, Andreozzi F, Perticone F, Siegel-Axel DL, Stefan N, Fritsche A, Salih HR, Schleicher E, Machicao F, Sesti G, Häring HU, Balletshofer BM: The CCR2 promoter polymorphism T-960A, but not the serum MCP-1 level, is associated with endothelial function in prediabetic individuals. *Atherosclerosis* 2008. 198(2): 338-46
4. Baltz, KM*, Krusch M*, Baessler T*, Schmiedel BJ, Bringmann A, Brossart P, and Salih HR: Neutralization of tumor-derived soluble glucocorticoid-induced TNF related protein (GITR) ligand increases NK cell anti-tumor reactivity. *Blood* 2008. 112(9):3735-43
5. Armeanu S, Krusch M, Baltz KM, Thomas S, Weiss TS, Smirnow I, Steinle A, Lauer UM, Bitzer M, and Salih HR: Direct and Natural Killer cell-mediated anti-tumor effects of low-dose Bortezomib in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008. 14(11):3520-8
6. Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee HG, Steinle A, Krusch M, Salih HR: Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol.* 2008. 181(10):6711-9
7. Steinbacher J*, Baltz-Ghahremanpour KM*, Schmiedel BJ, Kanz L, Jung G, Grosse-Hovest L, and Salih HR. An Fc-optimized NKG2D-IgG fusion protein for induction of NK cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer* 2015. 136(5): 1073-8

* Authors contributed equally to this work.