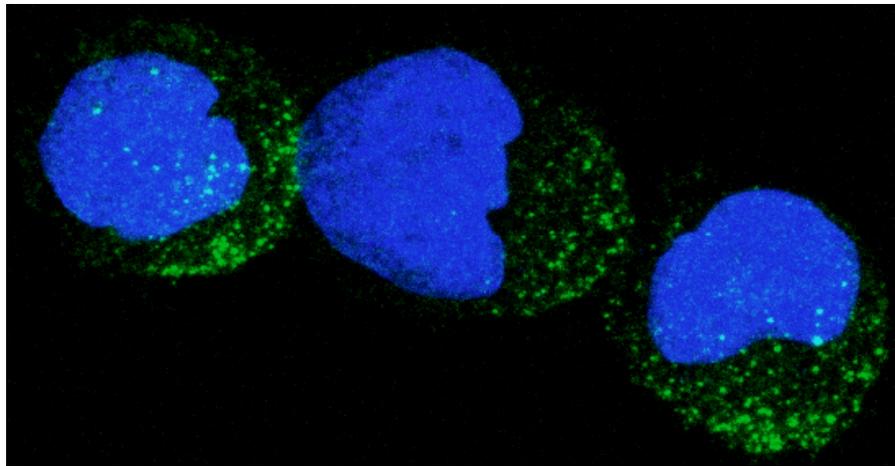


Der NK-Zellrezeptor NKG2D als Zielstruktur für eine Antikörper-basierte therapeutische Immunmodulation



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jutta Steigerwald

aus Erlenbach am Main

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. P. A. Baeuerle

Gutachter: Prof. Dr. M. Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

"See first, think later, then test. But always see first. Otherwise you will only see what you were expecting. Most scientists forget that."

Douglas Adams

"Men occasionally stumble over the truth, but most of them pick themselves up and hurry off as if nothing ever happened."

Sir Winston Churchill

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Natürliche Killer-Zellen als wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunantwort	10
1.2 Rezeptoren der NK-Zellen	12
1.3 NKG2D - ein aktivierender Immunrezeptor auf NK-Zellen	15
1.4 NKG2D-Liganden: Redundanz und Diversität	18
1.5 Die Signaltransduktion des NKG2D-Rezeptors	20
1.6 Effektorfunktionen des NKG2D-Rezeptors bei der Aktivierung von Immunzellen und natürlicher Zytotoxizität	21
1.7 Der NKG2D-Rezeptor: Implikationen für angeborene Immunabwehr und Autoimmunität	23
1.7.1 NKG2D und Infektionskrankheiten	23
1.7.2 NKG2D und Graft versus Host Disease (GvHD)	23
1.7.3 NKG2D und Tumormunität	23
1.7.4 NKG2D und Autoimmunität	25
1.7.5 Aktuelle therapeutische Ansätze	27
1.8 Antikörper: Struktur und Funktionalität	29
1.9 Generierung und Entwicklung therapeutischer Antikörper	30
1.9.1 Humanisierung von Antikörpern mittels Phagen-Display	30
1.9.2 Therapeutische Antikörper	32
1.10 Problemstellung und Zielsetzung	34
2. Material	36
2.1 Geräte	36
2.2 Laborbedarf	37
2.3 Kits	38
2.4 Puffer und Lösungen	38
2.5 Zellkultur	39
2.5.1 Zelllinien	39
2.5.2 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur	39
2.5.3 Zellkulturmedien und Kultivierungsbedingungen	40
2.6 Bakterienkultur	41
2.6.1 Bakterienstämme	41
2.6.2 Kulturmedien	41
2.6.3 Antibiotika	42
2.7 Reagenzien für molekularbiologische Methoden	42
2.7.1 Enzyme und andere Reagenzien	42
2.7.2 DNA-, Proteinmarker und Ladepuffer	42

2.7.3	Oligonukleotide	42
2.7.4	Vektoren	47
2.8	Immunologische Reagenzien	48
2.8.1	Antikörper	48
2.8.2	Rekombinante Proteine	50
2.9	Chemikalien und sonstige Reagenzien	50
2.10	Computersoftware und Datenbanken	51
3.	Methoden	52
3.1	Molekularbiologische Methoden	52
3.1.1	RNA-Isolation aus stimulierten humanen NK-Zellen oder PBMCs	52
3.1.2	Analyse der Genexpression mittels Microarray	53
3.1.3	cDNA-Synthese	54
3.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	54
3.1.5	Aufreinigung von DNA	55
3.1.5.1	Isolation von DNA aus Agarosegelen	55
3.1.5.2	Isolation von DNA aus PCR-, Restriktions- oder Ligations-Ansätzen	55
3.1.6	Bakterienkultur	56
3.1.7	Plasmidgewinnung aus <i>E. coli</i>	56
3.1.7.1	Mini-Plasmidpräparation	56
3.1.7.2	Midi-Plasmidpräparation	57
3.1.7.3	Maxi-Plasmidpräparation	57
3.1.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	58
3.1.8.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	58
3.1.8.2	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Massenstandards im Agarosegel	58
3.1.9	Sequenzierung	58
3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	59
3.2.1	Amplifikations- und Fusions-PCR	59
3.2.2	Kolonie-Screening-PCR	60
3.2.3	Semiquantitative RT-PCR	61
3.2.4	Einführung von Punktmutationen über PCR	62
3.3	Klonierungen	63
3.3.1	Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	63
3.3.2	Dephosphorylierung von Vektoren mit Alkalischer Phosphatase	64
3.3.3	Ligation von DNA	64
3.3.4	Klonierung in pGEM-T Easy Vektor	64
3.3.5	Klonierung von unterschiedlichen NKG2D- und DAP10-Spezies in die Expressionsvektoren pEF-DHFR und pEF-ADA	65
3.3.6	Umklonierung der humanen scFv in ein humanes IgG Antikörperformat	66
3.3.7	Transformation von <i>E. coli</i>	67
3.3.7.1	Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien	67
3.3.7.2	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	67

3.4 Phagen-Display	68
3.4.1 Produktion von VCSM13 Helferphagen	68
3.4.2 Herstellung von scFv-Bibliotheken	69
3.4.2.1 Subklonierung der VH- und VL-Fragmente in den Phagemid-Vektor pComb5BHis	69
3.4.2.2 Elektroporation	71
3.4.3 Isolation von Phagen aus Kulturüberstand	71
3.4.4 Selektion von antigenbindenden scFv-Phagen mittels Platten-Panning	71
3.4.5 Infektion von <i>E. coli</i> XL1-Blue mit eluierten scFv-Phagen und erneute Phagenamplifikation	72
3.4.6 Bestimmung des Input- und Output-Phagentiters	73
3.4.7 FACS-Screening	73
3.4.7.1 Expression antigenspezifischer scFv und Periplasmapräparation	73
3.4.7.2 Selektion antigenspezifischer scFv mittels FACS	75
3.4.7.3 Schrittweise Humanisierung	75
3.5 Affinitätsmaturierung humaner Anti-hNKG2D Antikörper	76
3.5.1 Randomisierung der CDR3-Bereiche von VH und VL	76
3.5.2 Selektion von antigenspezifischen scFv-Phagen mittels in solution-Panning	78
3.5.3 Produktion und Aufreinigung kleiner scFv-Mengen über Ni-NTA Zentrifugationssäulen	79
3.6 Transfektion	80
3.6.1 Transiente Transfektion von HEK293-F-Suspensionszellen	80
3.6.2 Stabile Transfektion von CHO-dhfr ⁻ -Zellen	80
3.7 Eukaryotische Proteinexpression und –aufreinigung	83
3.7.1 Aufreinigung von humanem löslichem NKG2D-His über IMAC	83
3.7.2 Aufreinigung der Antikörper über eine Protein G HP-Säule	83
3.8 PEG-Biotinylierung von humanem löslichen NKG2D-Protein, ULBP-2Fc- und CD25Fc-Protein	84
3.9 Proteinbiochemische Methoden	85
3.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	85
3.9.2 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-Page	85
3.9.3 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-Page	85
3.9.4 Westernblot	86
3.9.4.1 Anti-His Detektion von His ₆ -markierten scFv	86
3.9.4.2 Anti-His Detektion von His ₆ solhNKG2D	86
3.9.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über OD ₂₈₀ -Messung	87
3.9.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay	87
3.10 Zellkultur	88
3.10.1 Zellzahlbestimmung	88
3.10.2 Isolation von PBMCs aus Humanblut	88
3.10.3 Isolation von PBMCs aus Primatenblut	89
3.10.4 Aufreinigung von primären NK-Zellen aus PBMCs mittels Magnetbeads	89

3.10.5 Stimulation von NK-Zellen für Microarray, semiquantitative RT-PCR und Proteinexpressionsanalysen	90
3.10.6 Stimulation von NK-Zellen für funktionelle Anti-hNKG2D Antikörper Studien	91
3.10.7 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien	92
3.11 Funktionelle Tests mit Anti-hNKG2D Antikörpern	92
3.11.1 Untersuchung der Bindungskinetik im Biacore	92
3.11.2 Durchflusszytometrie	94
3.11.2.1 Untersuchung der Expressionseigenschaften von Zelllinien	94
3.11.2.2 Test der biologischen Aktivität von aufgereinigtem His ₆ solhNKG2D-PEGbio	96
3.11.2.3 Überprüfung des Reinheitsgrades isolierter humaner NK-Zellen	96
3.11.2.4 Messung von TNF α , IFN γ und IL-8 im Zellkulturüberstand stimulierter NK-Zellen	97
3.11.2.5 Untersuchung der Kreuzreaktivität von Anti-hNKG2D Antikörpern	99
3.11.2.6 Untersuchung der Thermostabilität von Anti-hNKG2D Antikörpern	100
3.11.2.7 Untersuchung der Serumstabilität von Anti-hNKG2D Antikörpern	100
3.11.2.8 Untersuchung der Bindungsaktivität von Anti-hNKG2D-Antikörpern oder -scFv im FACS	101
3.11.2.9 Untersuchung der Kompetition der ULBP-2Fc-Bindung an CHO-NKG2D ⁺⁺ /DAP10 ⁺⁺ -Zellen durch Anti-hNKG2D-Antikörper oder -scFv	101
3.11.3 <i>In vitro</i> -Funktionalitätsstudien der Anti-human NKG2D Antikörper	102
3.11.3.1 Untersuchung der Blockeffizienz von Anti-hNKG2D Antikörpern im radioaktiven ⁵¹ Cr-Freisetzungs-Assay	102
3.11.3.2 Untersuchung der Induktionseigenschaften der Anti-hNKG2D Antikörper im Redirected Lysis-Experiment	104
3.11.4 ELISA	104
3.11.4.1 Streptavidin-PEGbio NKG2D ELISA	104
3.11.4.2 Human GM-CSF ELISA	104
3.11.4.3 Human CCL3/CCL4/Fas-Ligand/XCL1 ELISA	105
3.11.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	106
3.11.5.1 Konjugation von Antikörpern mit Alexa Fluor 488	106
3.11.5.2 Untersuchung der Internalisierung von Anti-hNKG2D Antikörpern	109
4. Ergebnisse	110
4.1 Untersuchung der Genexpression primärer humaner NK-Zellen nach Stimulation mit ULBP-1Fc mittels Microarray	110
4.1.1 Experimentelles Design und Vorversuche	110
4.1.2 Nach Aktivierung des Rezeptors NKG2D kommt es in humanen NK-Zellen ausschließlich zu einer positiven Regulation der Genexpression	113
4.1.3 Verifizierung möglicher NKG2D-abhängiger Biomarker auf Proteinebene	116
4.1.3.1 Infolge der Stimulation des NKG2D-Rezeptors wird das Membranprotein CRTAM verstärkt von NK-Zellen auf deren Zelloberfläche exprimiert	116
4.1.3.2 Eine NKG2D-vermittelte Aktivierung induziert in humanen NK-Zellen die Freisetzung der Zytokine IFN γ , TNF α und GM-CSF und der Chemokine IL-8, CCL3 und CCL4	117
4.1.4 Eine durch ULBP-1Fc-Stimulation verstärkte Expression von IL-3 und XCL1 lässt sich mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestätigen	118
4.2 Generierung eines humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörpers	122
4.2.1 Charakterisierung monoklonaler muriner Anti-hNKG2D Antikörper	122

4.2.1.1	Die murinen Anti-hNKG2D Antikörper binden an membranständiges NKG2D von CHO-Transfektanten und können eine Interaktion mit dem Liganden ULBP-2Fc kompetitieren	123
4.2.1.2	Vorversuche zur Etablierung von Zytotoxizitätsstudien mit murinen Anti-hNKG2D Antikörpern	126
4.2.1.3	Die murinen Anti-hNKG2D Antikörper können eine NKG2D-vermittelte Lyse sowohl blockieren als auch induzieren	129
4.2.2	Herstellung eines biotinylierten humanen NKG2D-Proteins für den Einsatz als Antigen im Platten-Panning-Verfahren	131
4.2.3	Generierung eines NKG2D-spezifischen scFv durch Austausch der murinen VL gegen eine humane VL mit Hilfe des Phagen-Display	133
4.2.4	Schrittweise Humanisierung der VH	139
4.2.5	Produktion und Charakterisierung eines humanen Anti-hNKG2D Antikörpers	145
4.2.5.1	Klonierung und Produktion des E1VLV71KVH als vollständigen IgG1 Antikörper	145
4.2.5.2	Der humane E1VLV71KVH-Antikörper besitzt verringerte antagonistische Fähigkeiten im ⁵¹ Cr-Freisetzung-Assay	147
4.3	Affinitätsmaturierung eines humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörpers	149
4.3.1	Randomisierung der CDR3-Region von VL und VH	149
4.3.2	Affinitätsmaturierung der humanen E1VL mit Hilfe des in solution-Pannings	152
4.3.3	Generierung von drei hoch affinen humanen VL-Ketten mit Hilfe des in solution-Pannings	155
4.3.4	Identifizierung von fünf hoch affinen Klonen mittels Affinitätsmaturierung der humanisierten V71KVH	158
4.4	Charakterisierung der maturierten humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörper	162
4.4.1	Vergleichende Untersuchung ihrer Bindungsaffinitäten mittels FACS und Biacore	162
4.4.1.1	Die maturierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine deutlich verbesserte Bindung an membranständiges NKG2D	163
4.4.1.2	Die maturierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper besitzen eine deutlich höhere Affinität	164
4.4.2	Produktion der hoch affinen humanen Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH	165
4.4.3	Untersuchung der Temperatur- und Serumstabilität	166
4.4.4	Analyse der Kreuzreaktivität	167
4.4.4.1	Klonierung verschiedener NKG2D- und DAP10-Spezies	168
4.4.4.2	Die affinitätsmaturierten Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH zeigen eine veränderte Kreuzreaktivität	172
4.4.5	Die affinitätsmaturierten Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH weisen in den ⁵¹ Cr-Freisetzung-Experimenten eine deutlich bessere biologische Aktivität auf	174
4.4.6	Untersuchung der biologischen Funktionalität anhand von NKG2D-abhängigen Biomarkern	176
4.4.6.1	Die humanen Antikörper können die Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren induzieren	176
4.4.6.2	Die humanen Antikörper können eine NKG2D-induzierte Zytokinfreisetzung inhibieren	178
4.4.7	Untersuchung der Internalisierung von humanen Anti-hNKG2D-Antikörpern	180

5. Diskussion	184
5.1 NKG2D-vermittelte Genexpression	184
5.1.1 Eine ULBP-1Fc Stimulation induziert in humanen NK-Zellen sowohl positive als auch negative Regulationsmechanismen	185
5.1.2 Die Stimulation von NKG2D mit ULBP-1Fc führt zu einem Anstieg der Expression bestimmter membranständiger Aktivierungsmarker	191
5.1.3 Die Aktivierung des NKG2D-Rezeptors durch seinen Liganden ULBP-1Fc führt zur Sekretion immunmodulatorischer Zytokine und Chemokine	194
5.2 Phagen-Display-Selektion der VL und anschließende schrittweise Humanisierung der VH führen zur Generierung des schwach neutralisierenden Anti-hNKG2D scFv E1VLV71KVH	198
5.2.1 Generierung zweier humaner VL-Ketten mittels Phagen-Display	198
5.2.2 Schrittweise Humanisierung der murinen 6H7 VH unter Beibehaltung der murinen CDRs	200
5.3 Generierung fünf hoch affiner humaner Anti-hNKG2D Antikörper mittels Affinitätsmaturierung der VL und VH des E1VLV71KVH	202
5.4 Funktionsanalyse der humanen Anti-hNKG2D Antikörper E1VLV71KVH, B1VLB6VH und E4VLG10VH	204
5.4.1 Konvertierung der scFv in ganze humane Anti-hNKG2D Antikörper	204
5.4.2 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine deutlich erhöhte Bindungsaffinität	204
5.4.3 Die humanen Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine hohe Temperatur- und Serumstabilität	205
5.4.4 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper weisen verstärkte Kreuzreaktivitäten auf	206
5.4.5 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine verbesserte biologische Aktivität in den ⁵¹ Cr-Freisetzungsexperimenten	207
5.4.6 Die ambivalente Funktionalität der humanen Anti-hNKG2D Antikörper kann mit Hilfe von Biomarkern bestätigt werden	209
5.4.7 Humane Anti-hNKG2D Antikörper werden nach Interaktion mit ihrem Zielantigen NKG2D von humanen NK-Zellen internalisiert	210
5.4.8 Klinische Relevanz der humanen Anti-hNKG2D Antikörper	212
6. Zusammenfassung	218
7. Summary	220
8. Abkürzungen	222
9. Literaturverzeichnis	226
Lebenslauf	241
Publikationen	242
Danksagung	243
Ehrenwörtliche Erklärung	245

1. Einleitung

1.1 Natürliche Killer-Zellen als wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunantwort

Natürliche Killer (NK)-Zellen wurden erst in der Mitte der 70er Jahre von R. Kiessling und R. Herberman beschrieben (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975; Ljunggren & Malmberg, 2007). Sie besitzen die besondere Eigenschaft, *in vitro* murine Tumorzellen ohne eine vorausgegangene Sensibilisierung des Immunsystems zu lysieren. Diese Entdeckung ließ sie als wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems in der frühen Phase der Immunantwort zu einem interessanten Objekt weiterer Forschungen werden.

Etwa 10-15% der zirkulierenden Lymphozyten sind NK-Zellen. Sie bilden neben B- und T-Zellen eine weitere Lymphozyten-Population. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen stellen NK-Zellen eine lymphatische Population dar, die keine klonal erzeugten antigenspezifischen Rezeptoren besitzt und nach Antigenkontakt keiner somatischen Rekombination unterliegt. *In vitro* lassen sie sich in Abhängigkeit bestimmter Faktoren, wie IL-15, IL-2, IL-3, IL-7, SCF und FLT-3L, aus CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen differenzieren (Grzywacz et al., 2006). Im Humansystem werden NK-Zellen über das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD56 (N-CAM, Neural-Cell Adhesion Molecule) bei gleichzeitigem Fehlen des T-Zell-Markers CD3 charakterisiert und somit als CD56⁺CD3⁻-Lymphozyten-Population definiert. Diese lässt sich anhand des Expressionslevels der Moleküle CD56 und CD16 nochmals in eine CD56^{bright}CD16^{dim}- und CD56^{dim}CD16^{bright}-Population unterteilen (Cooper et al., 2001). Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer physiologischen Funktionalität. Die CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Zytokin- und Chemokinproduktion (TNF α , IFN γ , GM-CSF, MIP-1 α und MIP-1 β) maßgeblich an immunregulatorischen Prozessen beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung von angeborenem und adaptivem Immunsystem, indem sie mit benachbarten dendritischen Zellen (DC) und T-Zellen in Interaktion treten (Hanna et al., 2004a; Schrama et al., 2006b; Long, 2007). CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen, welche mit über 90% die Mehrheit der im peripheren Blut befindlichen NK-Zellen darstellen, besitzen hingegen primär zytotoxische Funktionen. Sie sind in der Lage, virusinfizierte und transformierte Zellen aus dem Organismus zu beseitigen.

Für die Erkennung und die darauf folgende Lyse der Zielzelle können NK-Zellen zwei unterschiedliche Mechanismen verwenden. Dies sind die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC), sowie die natürliche Zytotoxizität.

ADCC basiert auf der Expression des CD16-Moleküls auf der Zelloberfläche von NK-Zellen. Dieser niedrig affine Fc-Rezeptor (Fc γ RIII) bindet den Fc-Teil von IgG-Antikörpern. Für diese Form der Zytotoxizität muss jedoch zuvor eine Sensibilisierung des Immunsystems zusammen mit einer klonalen Expansion von B-Zellen und einer Antikörperproduktion gegen ein bestimmtes Fremdanigen stattgefunden haben. Die Zielzelle wird mit den produzierten antigenspezifischen Antikörpern aus der vorangegangenen Immunreaktion dekoriert und somit für die NK-Zelle markiert. Diese bindet den Fc-Teil der Antikörper über den Fc-Rezeptor, wird aktiviert und lysiert die Zielzelle.

Die natürliche Zytotoxizität hingegen läuft auch ohne eine vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung ab. Hierzu steht den NK-Zellen wie den B- und T-Zellen ein großes Repertoire an unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren zur Verfügung (Tab. 1). Diese Rezeptoren können entweder inhibierende oder aktivierende Signale an die NK-Zelle weiterleiten. Letztendlich entscheidet die Summe der Signale, ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht. Die Lyse der Zielzelle erfolgt schließlich aufgrund der Tatsache, dass nach Aktivierung der NK-Zelle Granzyme und Perforine aus den zytotoxischen Granula in die immunologische bzw. zytotoxische Synapse sezerniert werden. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass nicht nur CTLs (Cytotoxic T-Lymphocytes), sondern auch IL-2-aktivierte NK-Zellen zu einem sogenannten Serial Killing in der Lage sind (Bhat & Watzl, 2007). Mit Hilfe einer Time-Lapse Video-Mikroskopie konnte beobachtet werden, dass NK-Zellen bis zu viermal hintereinander Zielzellen lysieren können und dies durch den Zusatz des therapeutischen Antikörpers Rituximab, der gegen das Antigen CD20 auf B-Zell-Lymphomen gerichtet ist, verstärkt werden kann.

Die natürliche Zytotoxizität spielt vor allem bei der Beseitigung von entarteten körpereigenen Zellen eine Rolle und wird über die sogenannte Missing-Self-Hypothese erklärt, die von Ljunggren und Kärre beschrieben wurde (1985; 1986; 1990) (Abb. 1). Gemäß dieser Theorie erkennen NK-Zellen ihre Zielzellen an dem Verlust oder einer Veränderung von MHC-Klasse-I-Oberflächenmolekülen, sozusagen an einem fehlenden Selbst. Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden in erster Linie von inhibierenden Rezeptoren erkannt, so dass bei einem Kontakt zwischen einer gesunden Körperzelle und einer autologen NK-Zelle keine Zytotoxizität eingeleitet wird (Abb. 1A). Exprimiert die Zielzelle jedoch aufgrund einer Infektion oder Transformation nur wenige, keine oder veränderte MHC-Klasse-I-Komplexe (z.B. MICA/B), so können nur wenige Liganden an die hemmenden Rezeptoren (z.B. KIR) auf der NK-Zelle binden. Dies hat zur Folge, dass die Signale der aktivierenden Rezeptoren (z.B. NKG2D) ein stärkeres Gewicht bei der Regulation der NK-Zell-Antwort gewinnen, somit die NK-Zelle aktiviert wird und ihre Zielzelle lysiert (Abb. 1B). Man bezeichnet diesen Vorgang auch als Induced-Self

(Gonzalez et al., 2006). Hierbei wird zwischen der Effektorzelle und Zielzelle eine sogenannte immunologische Synapse ausgebildet, deren Effizienz durch die Polarisierung der NK-Zelle und einer Akkumulation von NKG2D in bestimmten Membrandomänen, den sogenannten Lipid Rafts, verstärkt wird (Watzl, 2003; Watzl & Long, 2003; Endt et al., 2007).

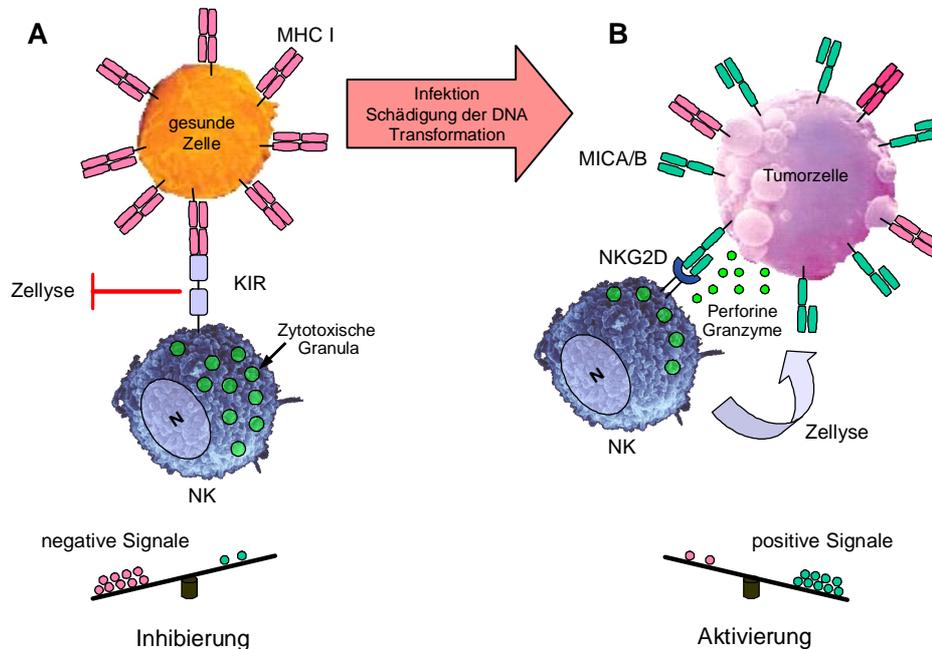


Abbildung 1: Immunologische Synapse, Missing-Self- und Induced-Self-Hypothese. Der Aktivierungszustand einer NK-Zelle ist abhängig von der Summe inhibierender und aktivierender Signale, die sie aus ihrem Umfeld durch Interaktion mit anderen Zellen erhält. **A** Missing-Self: Inhibierende Signale (z.B. KIR-Rezeptoren) blockieren positive Signale von aktivierenden Rezeptoren (z.B. NKG2D). **B** Induced-Self: Eine durch Stress induzierte Hochregulation von NKG2D-Liganden auf der Zielzelle und die damit verbundene Zunahme an positiven Signalen bewirkt die Aktivierung der NK-Zelle.

Im Zuge weiterer Forschungen wurden jedoch Zellen gefunden, die trotz normaler MHC-Klasse-I-Expression lysiert wurden, sowie Zellen mit fehlender oder fehlerhafter MHC-Klasse-I-Expression, die keine Aktivierung von NK-Zellen bewirkten (z.B. Erythrozyten). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Regulation der NK-Zell-Aktivität komplizierter sein muss und sich nicht allein durch die Missing-Self-Hypothese erklären lässt (Lanier, 2005). In Folge intensiver Forschungen wurde schließlich eine ganze Palette inhibierender und aktivierender NK-Zell-Rezeptoren entdeckt, die ihren Teil zur Regulation der NK-Zell-Aktivität beitragen.

1.2 Rezeptoren der NK-Zellen

Bisher sind im Humansystem zwei Rezeptorfamilien bekannt, die durch die Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen oder noch unbekanntem Liganden den Aktivierungszustand der NK-Zelle regulieren: Die Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (z.B. KIR: Killer Cell Ig-Like Receptors; LIR: Leucocyte Ig-Like Receptor; NCRs: Natural Cytotoxicity Receptors:

NKp30, NKp46, NKp44; IRp60; 2B4/CD244; NTB-A; DNAM1/CD226) und die C-Typ Lektin-ähnlichen NK-Zell Rezeptoren (z.B. CD94/NKG2, NKG2D, NKp80, NKRP1) (Biassoni et al., 2003). Die Liganden für KIR- und einige LIR-Rezeptoren sind sowohl klassische (Klasse Ia) HLA-Klasse-I Moleküle als auch nicht-klassische (Klasse Ib) HLA-A, -B, -C -Moleküle. Die C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren der NKG2-Familie sind Heterodimere bestehend aus CD94, das kovalent mit einem Molekül der NKG2-Familie (NKG2A, NKG2C) assoziiert ist. Der Ligand dieser Rezeptorfamilie ist in der Regel das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E. NKG2D, das ebenfalls zur Familie der NKG2-Rezeptoren gehört, bildet hier jedoch eine Ausnahme. Es wird als Homodimer zusammen mit dem Adaptermolekül DAP10, das ebenfalls ein Homodimer bildet, an der Zelloberfläche exprimiert. Die Liganden des NKG2D-Rezeptors sind die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA, MICB und ULBPs (UL16 Binding Proteins) (Borrego et al., 2001). Alle bereits erwähnten Rezeptoren besitzen entweder inhibierende oder aktivierende Eigenschaften (Tab. 1).

Tabelle 1: Rezeptorvielfalt auf humanen NK-Zellen des peripheren Blutes. Die Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptoren auf humanen NK-Zellen und ihrer dazugehörigen Liganden, die an der Regulation der NK-Zellaktivität beteiligt sind. (Modifizierte Abbildung nach Biassoni et al., 2003; Bottino et al., 2004; Bryceson et al., 2006a; Welte et al., 2006)

Aktivierende Rezeptoren		Inhibierende Rezeptoren					
	Name	Ligand	Name	Ligand			
ITAM	CD16 (FcRIIIa)	IgG	ITIM	KIR2DL1	HLA-C Gruppe 2	MHC	
	NKp30 (CD337)	?		KIR2DL2/3	HLA-C Gruppe 1		
	NKp44 (Ly95)	virales Hämagglutinin		KIR3DL1	HLA-B Allele		
	NKp46 (CD335/Ly94)	virales Hämagglutinin		KIR3DL2	HLA-A Allele		
	KIR2DS1-2	HLA-C		LIR-1/IL T2	HLA-Klasse I		
	KIR2DS3-6	?		NKG2A (CD94/CD159a)	HLA-E		
	KIR3DS1	?		KLRG1	E/NP-Cadherin		
	NKG2C (CD94/159c)	HLA-E		NKR-P1 (CD161)	LLT1		
ohne ITAM	NKG2D (CD314)	ULBP, MICA/B		Siglec-7 (CD328)	Sialinsäure		kein MHC
	2B4 (CD244)	CD48		Siglec-9 (CD329)	Sialinsäure		
	CD2 (LFA-2)	LFA-3 (CD58)	IRp60 (CD300a)	?			
	CRACC (CD139)	CRACC (CD139)					
	NTB-A	NTB-A					
	DNAM-1 (CD226)	PVR (CD155), CD112					
	CD7	SECTM1, Galectin					
	CD59	C8, C9					
	By55 (CD160)	HLA-C					
	KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G (löslich)					
CD44	Hyaluronan						
Integrine	NKp80 (KLRF1)	AICL					
	LFA-1 (CD11a/18)	ICAM-1-5					
	MAC-1 (CD11b/18)	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen					
	CD11c/18	ICAM-1, iC3b					
	VLA-4 (CD49d/29)	VCAM-1, Fibronectin					
VLA-5 (CD49e/29)	Fibronectin						

Die Signaltransduktion inhibitorischer Rezeptoren wird hierbei über sogenannte ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory)-Motive im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren vermittelt. Während einer Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand wird das Tyrosin des ITIM-Motivs phosphoryliert, was zur Aktivierung der Phosphatasen SHP-1

und SHP-2 (Src-Homology Domain Bearing Tyrosine Phosphatases) führt und somit zu einem Abbruch der intrazellulären Aktivierungskaskade.

Bei den aktivierenden Rezeptoren hingegen gibt es mehrere Möglichkeiten, um Signale in das Innere der Zelle zu transduzieren. Sie können z.B. mit Adaptermolekülen wie CD3 ζ (z.B. NKp46, NKp30, CD16), Fc ϵ R1 γ (z.B. NKp46, CD16) oder DAP12 (z.B. NKp44, KIR2DS, CD94/NKG2C) assoziiert sein, die in ihrer zytoplasmatischen Region ein sogenanntes ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activating)-Motiv besitzen. Nach dessen Phosphorylierung wird eine Aktivierungskaskade über die Tyrosinkinase Syk (p72^{syk}) und der Phosphotyrosinkinase ZAP70 eingeleitet (Moretta et al., 2001; Biassoni et al., 2003; Bottino et al., 2004; Bryceson et al., 2006a). Der aktivierende Rezeptor NKG2D hingegen besitzt DAP10 als Adaptermolekül, das ein YINM (Tyr-Ile-Asn-Met)-Motiv als Phosphorylierungsdomäne enthält und eine Aktivierung über die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) initiiert (Watzl, 2003). Wichtige aktivierende Rezeptoren von NK-Zellen stellen auch die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) dar. Hierzu gehören NKp30, NKp44 und NKp46. Da die NCR NK-Zell-spezifisch sind, dienen sie häufig auch als NK-Zellmarker. NKp46 und NKp30 erlauben eine genaue Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten NK-Zellen. NCRs haben vermutlich die Aufgabe, bestimmte Tumoren und virusinfizierte Zellen zu erkennen. NKp46 erkennt Influenza-infizierte Zellen vermutlich durch direkten Kontakt mit dem Influenzahämagglutinin.

Andere Rezeptoren wie NKp80, CD244 (2B4), DNAM-1 und NTB-A spielen eine wichtige Rolle als aktivierende Korezeptoren bei der NK-Zell-vermittelten Zellyse. CD244 (2B4) bindet CD48 (Brown et al., 1998). DNAM-1, das mit LFA-1 assoziiert ist, erkennt den Polio Virus Rezeptor (PVR/CD155) und Nectin-2 (PRR2/CD112) (Shibuya et al., 1999; Bottino et al., 2003; Bottino et al., 2004; Bryceson et al., 2006b). NKp80 bindet AICL (Welte et al., 2006), und NTB-A bildet wie CRACC eine homotypische Interaktion aus (Flaig et al., 2004; Bryceson et al., 2006a).

Eine weitere Kategorie aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wird durch die Integrine repräsentiert, die Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit darstellen. LFA-1 (CD11a/CD18) z.B. bindet interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM1-5) und erleichtert durch eine Stabilisierung der zytotoxischen Synapse sowohl die natürliche als auch die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (Bryceson et al., 2006a).

Außerdem haben Forschungen ergeben, dass im Gegensatz zu IL-2-aktivierten NK-Zellen bei ruhenden, frisch aus dem Blut isolierten NK-Zellen die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors nicht ausreichend ist, um eine Zytotoxizität einzuleiten (Cerwenka et al., 2007). Erst die gleichzeitige Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren führt zur Aktivierung ruhender NK-Zellen (Bryceson et al., 2006b).

In den letzten Jahren der NK-Zell-Forschung konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen trotz ihres Namens nicht nur Tumorzellen aufgrund ihrer natürlichen Zytotoxizität beseitigen. Sie müssen zur Bewältigung dieser Aufgabe auch spezialisierte Interaktionen mit anderen Immunzellen wie z.B. DCs und T-Zellen eingehen. Hierfür wird wiederum ein komplexes System an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren benötigt (Bottino et al., 2004). Dies macht NK-Zellen und deren Rezeptoren besonders interessant für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Eines dieser neuen therapeutischen Zielantigene auf NK-Zellen ist der Rezeptor NKG2D, der nicht nur bei Tumorerkrankungen, sondern auch bei bestimmten Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

1.3 NKG2D - ein aktivierender Immunrezeptor auf NK-Zellen

Im Jahr 1991 wurde die cDNA verschiedener miteinander verwandter Transkripte, die primär von NK-Zellen exprimiert wurden, zum ersten Mal beschrieben (Houchins et al., 1991). Diese Gruppe von Genen, die innerhalb des NK-Gen Komplexes (NKC) auf dem humanen Chromosom 12p12-p13 und dem murinen Chromosom 6 lokalisiert sind, wurde als NKG2 (Natural Killer Group 2) bezeichnet und kodiert für eine Reihe von Rezeptoren der C-Typ Lektin Familie NKG2A, -C, -D -E, und -F (Kim et al., 2004). NKG2A, -C, und -E besitzen sehr ähnliche Sequenzen und bilden mit CD94 Heterodimere aus. Für NKG2F, das ebenfalls eng mit den vorher erwähnten Molekülen der NKG2-Familie verwandt ist, konnte bisher keine Assoziation mit CD94 festgestellt werden (Kim et al., 2004). Das NKG2D (Natural Killer Group 2 Member D)-Protein hingegen stimmt in seiner Sequenz nur zu etwa 20% mit den anderen Sequenzen der NKG2-Familie überein und ist nicht mit CD94 assoziiert (Lazetic et al., 1996; Li et al., 2001; Lanier, 2005).

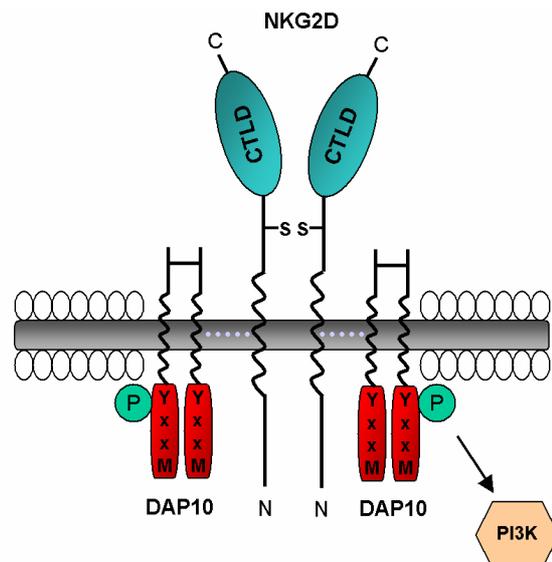


Abbildung 2: Struktur des humanen NKG2D-Rezeptors. Der NKG2D-Rezeptor ist ein homodimeres Typ II Transmembranprotein und gehört zur Gruppe der C-Typ Lektine. Die Monomere besitzen je eine C-Typ Lektin-ähnliche Domäne (CTLD) und sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Das humane NKG2D assoziiert über polare Wechselwirkungen (.....) mit dem signaltransduzierenden Adaptermolekül DAP10, das nach einer Tyrosinphosphorylierung die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) rekrutiert. (Modifizierte Abbildung nach Biassoni et al., 2003)

Der NKG2D-Rezeptor ist ein homodimeres Typ II Transmembran-Protein mit einer extrazellulären C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne, an die der Ligand Ca^{2+} -unabhängig bindet (Li et al., 2001; Radaev et al., 2001). Infolge verschiedener Transfektionsversuche konnte gezeigt werden, dass nur die Koexpression mit einem Adaptermolekül (DAP10 im

Menschen, bzw. DAP10 oder DAP12 in der Maus) zur Ausbildung eines funktionellen NKG2D-Rezeptors an der Membranoberfläche der Zelle führt (Wu et al., 1999b; Cosman et al., 2001; Gilfillan et al., 2002). Sowohl DAP10 als auch DAP12 sind homodimere Typ I Transmembranproteine, die negativ geladene Reste (Aspartat) innerhalb ihrer transmembranen Domäne besitzen. Diese interagieren mit positiv geladenen Resten (Arginin) innerhalb der transmembranen Domäne des NKG2D-Rezeptors und bilden auf diese Weise einen aktivierenden Immunrezeptorkomplex aus (Abb. 2). Die Interaktion von NKG2D sowohl mit DAP10 als auch DAP12 konnte nur für das murine NKG2D nachgewiesen werden (Rosen et al., 2004). In der Maus werden zu diesem Zweck zwei unterschiedliche Varianten des NKG2D synthetisiert. Die lange Form (NKG2D-L) assoziiert ausschließlich mit dem Adaptermolekül DAP12 und kommt hauptsächlich in ruhenden NK-Zellen vor. Die kurze Form (NKG2D-S) hingegen interagiert sowohl mit DAP10 als auch mit DAP12 und wird bei Aktivierung der NK-Zellen hochreguliert (Diefenbach et al., 2002). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass an der Zelloberfläche ein NKG2D-Homodimer immer zusammen mit zwei DAP10-Dimeren eine hexamere Struktur ausbildet. Auf diese Weise wird der Schwellenwert für bindende Liganden und damit für die Induktion der Signaltransduktion herabgesetzt (Garrity et al., 2005). Die Signaltransduktion über das Adaptermolekül DAP10 erfolgt über die kurze zytoplasmatische Region, die ein YxxM-Motiv besitzt. Diese dient als Phosphorylierungsdomäne und leitet eine Aktivierung über den Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)/Grb-2-Vav Signalweg ein (Wu et al., 1999b; Upshaw et al., 2006).

In der Maus wird NKG2D auf nahezu allen NK-Zellen exprimiert (Tab. 2). Bei ruhenden naiven CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen hingegen kann man kein NKG2D auf der Oberfläche finden. Erst nach Aktivierung der Zellen über den T-Zell Rezeptor (TCR) wird die Produktion des NKG2D und damit dessen Oberflächenexpression induziert. Zudem kann der Rezeptor auf antigenspezifischen CD8 T-Gedächtniszellen gefunden werden (Jamieson et al., 2002). Nahezu alle murinen $\gamma\delta$ T-Zellen der Epidermis (Dendritic Epidermal T Cells, DETCs) exprimieren NKG2D, während es bei den $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz nur ca. 25% sind. Ein großer Teil der murinen NK1.1 T-Zellen exprimieren ebenfalls NKG2D (Jamieson et al., 2002; Raulet, 2003). Auch murine peritoneale Makrophagen scheinen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder einer Kombination von IFN α und IFN β bzw. mit IFN γ den NKG2D-Rezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (Diefenbach et al., 2000; Jamieson et al., 2002). Ähnliches gilt für murine Eosinophile, auf denen NKG2D nach Aktivierung mit LPS und Eotaxin detektiert werden konnte (Kataoka et al., 2004). Die Expression von NKG2D auf stimulierten murinen Makrophagen, Monozyten oder Eosinophilen ist aber weiterhin umstritten, da ursprünglich darauf

hinweisende Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden konnten (Pende et al., 2001; Andre et al., 2004).

Im Gegensatz zur Maus ist der Rezeptor NKG2D im Humansystem auf allen NK-Zellen, allen CD8⁺ αβT-Zellen und allen γδT-Zellen vorhanden (Tab. 2) (Bauer et al., 1999). Auf CD4⁺ αβT-Zellen ist der Rezeptor in der Regel nicht nachweisbar, allerdings wurden in Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) untypische Populationen von CD28⁺ CD4⁺ αβT-Zellen gefunden, die NKG2D auf ihrer Membranoberfläche tragen. Für humane Makrophagen und Eosinophile konnte bisher kein eindeutiger Nachweis für eine NKG2D-Expression erbracht werden.

Tabelle 2: Vergleichendes Expressionsmuster des NKG2D-Rezeptors auf murinen und humanen Immunzellen. In der Tabelle sind die Expressionseigenschaften des NKG2D-Rezeptors im humanen und murinen System gegenübergestellt. Eine Expression auf Makrophagen und Eosinophilen ist bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen und deshalb mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. LPS: Lipopolysaccharid; IFN: Interferon; RA: Rheumatoide Arthritis; HCMV-spez.: Human Cytomegalovirus spezifisch. (Modifizierte Abbildung nach Raulet, 2003)

Zelltyp	Expressionsmuster von NKG2D	
	Murin	Human
NK-Zellen	~ 100%	~ 100%
CD8 ⁺ abT-Zellen	vor Aktivierung: nicht vorhanden nach Aktivierung: ~ 100% Antigenspez. T-Gedächtniszellen: ~ 100%	~ 100%
CD4 ⁺ abT-Zellen	Selten oder nicht vorhanden	normalerweise nicht vorhanden; hochreguliert in RA Patienten; Subpopulationen von HCMV-spez. CD4 T-Zellen
NK1.1 ⁺ T-Zellen	~ 70%	Nicht detektiert
gdT-Zellen	Milz γδT-Zellen: ~25% intestinale intraepitheliale γδ T Zellen: - dendritische epidermale γδ T Zellen: ~100%	periphere Blut γδT-Zellen: ~100% intestinale intraepithel. γδT-Zellen: ~100%
Makrophagen (MF)	vor Aktivierung: - ? nach Aktivierung (LPS/IFNαβγ): 100%	Nicht vorhanden ?
Eosinophile	vor Aktivierung: ~ 5% ? nach Aktivierung mit Eotaxin/LPS: ~ 20%	Zelllinien: HL-60, EoL-1 ? humane Eosinophile

Die Oberflächenexpression des NKG2D-Rezeptors kann durch Zytokine sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden. So konnte in verschiedenen Studien nach Stimulation mit den Zytokinen IL-2, IL-15, TNFα oder IFNα ein Anstieg, nach Zugabe von IL-21, TGFβ oder IFNγ eine Abnahme in der NKG2D-Expression an der Membranoberfläche von NK- und CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (Burgess et al., 2008).

Die NKG2D-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von NK- und CD8⁺ T-Zellen spielt vor allem bei der Immunreaktion gegenüber Tumoren und Pathogenen eine wichtige Rolle. Die Liganden des NKG2D-Rezeptors werden auf gesunden Zellen entweder gar nicht oder nur mit geringem Maße exprimiert. Erst wenn die Zelle durch eine Infektion oder

maligne Transformation gestresst wird, wird die Expression der NKG2D-Liganden induziert. Eine fehlerhafte Überexpression dieser Liganden kann in bestimmten Fällen zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen.

1.4 NKG2D-Liganden: Redundanz und Diversität

Die Liganden des NKG2D-Rezeptors sind sehr divers und unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur, ihres Expressionsmusters und der Bindungsaffinitäten voneinander (Tab. 3). Die ersten Liganden, die für humanes NKG2D entdeckt und beschrieben wurden, waren die MHC-Klasse-I verwandten Moleküle A und B (MICA und MICB) (Bauer et al., 1999). Diese Proteine sind eng miteinander verwandt und hoch polymorph (Stephens, 2001). Sie weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den MHC-Klasse-I-Molekülen auf und besitzen eine α 1-, α 2- und α 3-Domäne, jedoch kein β 2-Mikroglobulin (Cosman et al., 2001; Raulet, 2003). Außerdem haben sie im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen keine Peptide gebunden (Groh et al., 1996). Die Gene für die verschiedenen MICA und MICB Allele (MICA: 60; MICB: 25) sind in der MHC-Klasse-I-Region nahe des HLA-B Locus kodiert (Bahram et al., 2005). Sie besitzen jedoch nur eine 18-30%ige Sequenzhomologie zu HLA-A, -B oder -C (Gonzalez et al., 2006).

Tabelle 3: Diversität der NKG2D-Liganden. In der Tabelle sind sämtliche bekannte Liganden des NKG2D-Rezeptors im murinen und humanen System, ihre Struktur, ihre Expressions- und Bindungseigenschaften aufgelistet. Abkürzungen: MIC: MHC Class I Chain-Related Molecules; ULBP: Cytomegalovirus (CMV) UL16 Binding Protein; RAE/RAET: Retinoic Acid Early Transcript; MULT1: Murine ULBP Like Transcript 1; TM: Transmembrane Domäne; GPI: Glykosylphosphatidylinositol Lipid Anker; ND: Not determined. (Modifizierte Abbildung nach Watzl, 2003; Mistry & O'Callaghan, 2007)

Ligand	Expression	Struktur	Bindungsaffinität (K_D)
Human			
MICA	gastrointestinales Epithel, Thymus Epithel und verschiedene Tumore;	α 1, α 2, α 3 TM	$0.6-1 \times 10^{-7}$ M
MICB	induzierbar durch zellulären Streß: Transformation/Infektion		0.8×10^{-6} M
ULBP-1, -2, -3	normales Gewebe, Zelllinien und Tumore	α 1, α 2 GPI	ULBP-2 > ULBP-1 > ULBP-3 ULBP-1: 1.1×10^{-6} M
ULBP-4	Gewebe der Haut	α 1, α 2 TM	ND
Murin			
RAE-1 α	während der frühen Embryogenese;		ca. 7×10^{-7} M
RAE-1 β	nicht vorhanden in normalem		ca. 3×10^{-7} M
RAE-1 γ	adulten Gewebe;	α 1, α 2	ca. 5×10^{-7} M
RAE-1 δ	exprimiert auf einigen Tumoren	GPI	ca. 7×10^{-7} M
RAE-1 ϵ (B6)	induzierbar über Retinolsäure		ca. 2.8×10^{-8} M
H60	in Mausstämmen unterschiedlich exprimiert; auf Thymozyten und aktivierten Lymphozyten	α 1, α 2 TM	ca. 2×10^{-8} M
MULT1		α 1, α 2 TM	ca. 6×10^{-9} M

Eine weitere Gruppe von Liganden des humanen NKG2D-Rezeptors bilden die ULBPs ULBP-1, -2, -3 und -4, die ihren Namen aufgrund ihrer Bindung an das humane Cytomegalovirus Protein UL16 erhalten haben (Cosman et al., 2001). Wie MICA/B besitzen auch ULBPs in ihrer Struktur gewisse Ähnlichkeiten zu MHC-Klasse-I-Molekülen. Sie bestehen aus einer α 1- und α 2-Domäne, jedoch fehlt ihnen im Gegensatz zu den MIC-Molekülen die α 3-Domäne. Außerdem besitzen alle ULBPs bis auf ULBP-4 einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Lipid-Anker (Chalupny et al., 2003). Während die Expression der Liganden ULBP-1-3 in verschiedenen Gewebetypen nachgewiesen werden konnte, scheint die Expression von ULBP-4 auf die Haut beschränkt zu sein (Chalupny et al., 2003).

In der Maus existieren drei unterschiedliche Gruppen von NKG2D-Liganden, die Proteine RAE-1 α , - β , - γ , - δ und - ϵ (Retinoic Acid Early Transcript) (Cerwenka et al., 2000), das Histokompatibilitäts-Antigen H60 (Diefenbach et al., 2001) und MULT1 (Murine ULBP Like Transcript 1) (Carayannopoulos et al., 2002). Die murinen NKG2D-Liganden besitzen eine niedrige Sequenzhomologie zueinander (20-28%), sowie zu den α 1- und α 2-Domänen der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle. Wie den humanen ULBPs fehlt ihnen eine α 3-Domäne, und sie sind über einen GPI-Lipidanker in der Membran verankert (Cerwenka et al., 2000). Die Expression von MICA und anderen NKG2D-Liganden wird bei einer Neotransformation durch den sogenannten DNA-Damage Pathway als Antwort auf genotoxische Einflüsse induziert (Gasser et al., 2005; Gasser & Raulet, 2006). Die nachgewiesene Expression von MICA auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen zeigt, dass auch Zellaktivierung die Expression von NKG2D-Liganden bewirken kann (Molinero et al., 2003; Molinero et al., 2004; Maasho et al., 2005; Molinero et al., 2006).

Bindungsstudien des murinen NKG2D mit seinen Liganden H60 und RAE-1, und des humanen NKG2D mit dem Liganden MICA haben ergeben, dass jedes NKG2D-Homodimer jeweils nur ein einzelnes Liganden-Monomer bindet (Steinle et al., 2001).

Kristallstrukturanalysen von Bindungskomplexen bestehend aus NKG2D mit MICA, ULBP-3 oder RAE-1 β zeigten, dass NKG2D mit den α 1- und α 2-Domänen des Liganden interagiert (Li et al., 2001; Radaev et al., 2001). Die Art der Bindung ist bei den verschiedenen Liganden ähnlich, unterscheidet sich aber in der Orientierung der Liganden zum NKG2D-Rezeptor und in ihrer Bindungsaffinität (Radaev & Sun, 2003). Es wird vermutet, dass sich innerhalb der Gruppe der Liganden unterschiedliche Strategien entwickelt haben, um sich an vorrangigen Bindungsdomänen des NKG2D-Rezeptors anlagern zu können (McFarland et al., 2003). Ein Induced-Fit Mechanismus, bei dem der Rezeptor aufgrund der Änderung seiner Konformation und der damit einhergehenden Plastizität zur Bindung mehrerer unterschiedlicher Liganden in der Lage ist, konnte bereits ausgeschlossen werden (Radaev et al., 2002; Gonzalez et al., 2006).

Im Gegensatz zu den Liganden ist der NKG2D-Rezeptor hoch konserviert. So ist die extrazelluläre Domäne des humanen und des murinen NKG2D-Protein zu 69% identisch (McFarland et al., 2003). Es konnte sogar gezeigt werden, dass NKG2D-Rezeptoren einer Spezies die Liganden einer anderen Spezies binden können. So kann z. B. murines NKG2D humanes ULBP-1 und ULBP-2 binden (Sutherland et al., 2006). Humanes NKG2D ist in der Lage, porcines ULBP zu binden (Lilienfeld et al., 2006). Über Sinn und Nutzen der hohen Diversität an NKG2D-Liganden für den Wirt wird immer noch spekuliert. Möglicherweise entwickelte sich die Diversität der NKG2D-Liganden, um Mechanismen der Immunevasion von Pathogenen entgegen zu wirken (Eagle & Trowsdale, 2007).

1.5 Die Signaltransduktion des NKG2D-Rezeptors

Die Aktivierung des NKG2D-DAP10 Rezeptor-Komplexes durch Bindung eines Liganden oder durch Kreuzvernetzung mit einem Anti-NKG2D Antikörper leitet zwei getrennte Signaltransduktionswege zur Phosphorylierung von ERK (Extracellular Signal-Related Kinases) und c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) ein (Chen et al., 2007; Li et al., 2008) (Abb. 3). Beide Signalwege sind essentiell für die Polarisierung des Mikrotubuli-Organisationszentrums (MTOC) und der zytotoxischen Granula in Richtung der immunologischen Synapse. Diese beiden Vorgänge spielen bei der NK-Zell Zytotoxizität eine zentrale Rolle (Billadeau et al., 2003).

Zu Beginn des Signaltransduktionsweges findet eine Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb des Tyr-Ile-Asn-Met (YINM bzw. YxxM) Motives der zytoplasmatischen Domäne des Adapters DAP10 statt. Die Phosphorylierung wird hierbei durch Kinasen der Src-Familie (SFK) vermittelt (Billadeau et al., 2003; Chen et al., 2007). Im Gegensatz zu den ITAM-vermittelten Signaltransduktionswegen ist die DAP10-vermittelte Aktivierung unabhängig von den intrazellulären Kinasen Syk und ZAP70 (Colucci et al., 2002).

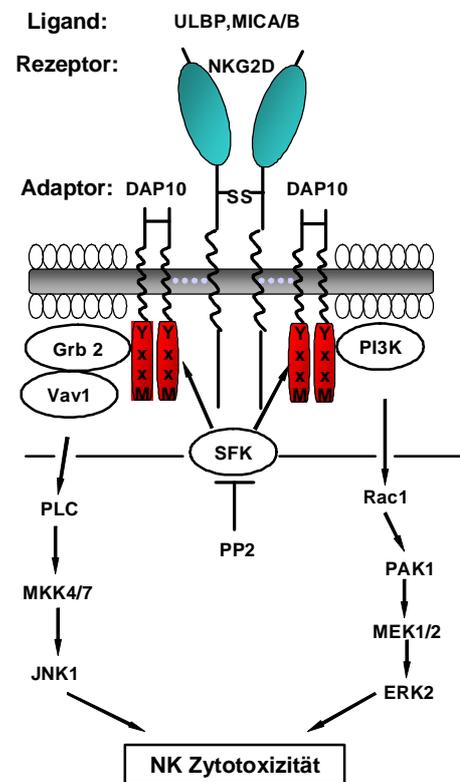


Abbildung 3: Signaltransduktion über den aktivierenden Rezeptor NKG2D. Nach der Bindung der Liganden an den NKG2D-Rezeptor initiieren Kinasen der Src-Familie (SFK) zwei Signaltransduktionswege, den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/ERK2 und den Phospholipase C γ (PLC)/JNK1 Signalweg. Beide Signalwege sind für die Induktion der Zytotoxizität der NK-Zelle erforderlich. (Modifizierte Abbildung nach Chen et al., 2007).

Die Aktivierung des PI3K-Signalweges wird durch die Bindung und Aktivierung der p85 Untereinheit der PI3K infolge der Tyrosin-Phosphorylierung des DAP10 eingeleitet (Wu et al., 1999b). Die Rekrutierung der PI3K führt zur Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 (Vivier et al., 2004). Dies wiederum führt über die p21-aktivierte Kinase (PAK1) und die Mitogen-aktivierten oder durch extrazelluläre Signale regulierten Protein Kinasen (MEK) zu einer sequentiellen Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) ERK (Sutherland et al., 2002; Cella et al., 2004; Meresse et al., 2004; Vivier et al., 2004). Neben der Untereinheit p85 konnte auch für Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein) eine direkte Bindung an phosphoryliertes DAP10 nachgewiesen werden (Upshaw et al., 2006). Das Adapterprotein Grb2 bindet hierbei an den Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Vav1. Die Bindung des Grb2-Vav1-Komplexes an DAP10 initiiert hierbei die Phosphorylierung von Vav1 und die anschließende Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) (Upshaw et al., 2006). Dies führt wiederum über die Kinasen MKK zur Aktivierung von JNK (Meresse et al., 2004; Nausch et al., 2006; Chen et al., 2007). Beide Signalwege führen letztendlich in der NK-Zelle zur Reorganisation des Zytoskeletts, zur Polarisierung der zytotoxischen Granula, zur Freisetzung von Perforin und Granzym in die immunologische Synapse und möglicherweise zur Freisetzung von Zytokinen (Vivier et al., 2004; Chen et al., 2007; Li et al., 2008).

Das Resultat einer NKG2D-vermittelten Stimulation ist zudem abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle und vom Zell-Typ. So ist bei ruhenden humanen NK-Zellen die Stimulation über einen Anti-NKG2D Antikörper nicht ausreichend, um Zellproliferation oder Zytokinfreisetzung einzuleiten (Ho et al., 2002). Dies ist erst durch zusätzliche Signale wie Zytokine (z.B. IL-2) oder andere aktivierende Rezeptoren (z.B. Nkp46 und 2B4) möglich (Jamieson et al., 2002; Andre et al., 2004; Bryceson et al., 2006b).

Während bei humanen NK-Zellen eine direkte Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor möglich ist, fungiert er in humanen CD8⁺ T-Zellen ähnlich wie CD28 als kostimulatorischer Rezeptor (Groh et al., 2001; Maasho et al., 2005). Eine Inhibierung des aktivierenden NKG2D-Signals konnte bei gleichzeitiger Stimulation des NKG2A/CD94-Rezeptorkomplexes und der Rekrutierung der Protein Tyrosin Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 festgestellt werden (Vivier et al., 2004; Masilamani et al., 2006).

1.6 Effektorfunktionen des NKG2D-Rezeptors bei der Aktivierung von Immunzellen und natürlicher Zytotoxizität

Die Funktion des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen wurde in unterschiedlichen Versuchsansätzen wie z.B. in Kokulturen mit NKG2D-Liganden (MICA/B, ULBPs, RAE-1 und H60) transfizierten Zellen (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2000; Cosman et al., 2001; Pende et al., 2002), Stimulationen mit löslichen Liganden

(Kubin et al., 2001), Blockexperimenten mit Anti-NKG2D Antikörpern (Bauer et al., 1999; Pende et al., 2002) und sogenannten Redirected Lysis-Experimenten mit der Zelllinie P815 im Lyse-Assay analysiert. Mit Hilfe dieser *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des NKG2D-Rezeptors sowohl die Lyse Liganden-tragender Zellen als auch die Freisetzung von einigen proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , TNF α und GM-CSF induziert (Pende et al., 2001; Sutherland et al., 2002). Für die Freisetzung von Zytokinen wird jedoch ein weiteres aktivierendes Signal benötigt (Bryceson et al., 2006b).

Während NKG2D auf NK-Zellen die Fähigkeit besitzt, eine direkte Aktivierung der Zellen zu bewirken, besitzt er auf naiven CD8⁺ T-Zellen eher kostimulatorische Eigenschaften. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass bei gleichzeitiger Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen über TCR und NKG2D, sowohl die Produktion der Zytokine TNF α und IFN γ , als auch die Proliferation deutlich gesteigert werden können (Groh et al., 2001; Maasho et al., 2005; Zhang & Stastny, 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NKG2D daran beteiligt ist, naive CD8⁺ T-Zellen für eine Immunantwort zu präparieren und eine Entwicklung der Zellen in Richtung Tc1 zu ebnet. Somit stellt eine Kostimulation über NKG2D möglicherweise einen alternativen Mechanismus dar, um die Immunantwort zu verstärken und effizienter zu machen (Maasho et al., 2005). Für die Eliminierung Virus-infizierter und maligner Zellen stellt der NKG2D-Rezeptor ein wichtiges Element der natürlichen Zytotoxizität dar. Er spielt aber auch eine Rolle bei der Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort, die durch eine Interaktion von NK-Zellen mit DCs bzw. T-Zellen vermittelt wird. So konnte man nach Maturierung von DCs mit IL-15 oder IFN α *in vitro* und *in situ* eine Expression von NKG2D-Liganden (MICA/B und ULBP-1) feststellen (Jinushi et al., 2003; Schrama et al., 2006b). Die IFN α -induzierte MICA/B Expression auf DCs ermöglicht hierbei die Aktivierung von NK-Zellen über den NKG2D-Rezeptor bei einer Interaktion von reifen DCs mit NK-Zellen. Dies resultiert in einer erhöhten IFN γ -Produktion, CD69-Expression und zytotoxischer Aktivität von NK-Zellen gegenüber NKG2D-Liganden tragenden Zellen (Jinushi et al., 2003). Die Expression von ULBP-1 auf reifen DCs bei gleichzeitiger Anwesenheit NKG2D⁺-Antigen-spezifischer T-Zellen in Lymphknoten bei primären Melanomen, lässt vermuten, dass NKG2D eine wichtige Funktion bei der Induktion von Tumor-spezifischen T-Zell-Antworten übernimmt (Schrama et al., 2006b).

Es konnte auch gezeigt werden, dass NK-Zellen überaktivierte Makrophagen infolge eines NKG2D-vermittelten Mechanismus eliminieren können. Nach Stimulation von Makrophagen durch hohe LPS-Konzentrationen exprimieren diese sowohl ULBPs als auch MICA an ihrer Membranoberfläche und können so von NK-Zellen erkannt und aus dem Immunsystem entfernt werden (Nedvetzki et al., 2007).

1.7 Der NKG2D-Rezeptor: Implikationen für angeborene Immunabwehr und Autoimmunität

1.7.1 NKG2D und Infektionskrankheiten

Die außerordentliche Rolle des NKG2D-Rezeptors bei der Bekämpfung von viralen Infekten zeigt sich vor allem in der Vielfalt an Mechanismen, die Viren entwickelt haben, um der NKG2D-vermittelten Immunantwort zu entkommen. Sowohl humane als auch murine Cytomegaloviren (CMV) produzieren Proteine, welche die Zelloberflächenexpression von NKG2D-Liganden negativ regulieren und somit die Effektivität von NK- und CD8⁺ T-Zellen beeinträchtigen. Es wurde gezeigt, dass das virale Glykoprotein UL16 von HCMV MICB, ULBP-1 und ULBP-2 im endoplasmatischen Retikulum der virusinfizierten Zellen zurückhält (Dunn et al., 2003; Rolle et al., 2003; Welte et al., 2003), während ein anderes virales Protein UL142 die MICA-Expression negativ beeinflusst (Chalupny et al., 2006).

Bei chronischer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* in der Maus hat man festgestellt, dass eine effektive Immunantwort über CTLs IL-15 abhängig ist. Man vermutet, dass dies mit der Oberflächenexpression von NKG2D auf CTLs zusammenhängt, da diese von IL-15 positiv reguliert wird (Rausch et al., 2006).

1.7.2 NKG2D und Graft versus Host Disease (GvHD)

Die Interaktion von NKG2D und seinen Liganden hat auch Konsequenzen für Organtransplantationen. Man vermutet, dass eine Expression von MICA/B-Molekülen auf den Transplantaten aufgrund der NKG2D-vermittelten Immunantwort des Empfängers zu einer Abstoßung des Spenderorgans führt (Collins, 2004). Bei Transplantationen von Knochenmark im Mausmodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NK-Zellen aufgrund einer NKG2D/RAE-1 Interaktion aktiviert werden und das Knochenmarktransplantat abgestoßen wird. Eine Behandlung der Tiere mit einem neutralisierenden Anti-NKG2D Antikörper konnte diese Abstoßungsreaktion verhindern (Ogasawara et al., 2005). Das Ergebnis dieser Studie könnte einen möglichen therapeutischen Nutzen von Anti-NKG2D Antikörpern bei Transplantationen bedeuten.

1.7.3 NKG2D und Tumormunität

Die maligne Transformation normaler Zellen geht oft mit der Expression von NKG2D-Liganden, die als Stress-Signale dienen, einher (Hayakawa & Smyth, 2006). Im Normalfall werden daraufhin die Tumorzellen durch aktivierte NK-Zellen und CTLs

eliminiert. In einigen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine natürliche oder induzierte Liganden-Expression die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Lyse verstärkt (Bauer et al., 1999; Jamieson et al., 2002).

Die Interaktion von NKG2D mit seinen Liganden ist zwar für die Entfernung von Tumorzellen von großer Bedeutung, jedoch führt eine chronische Exposition mit membrangebundenem oder löslichem Liganden aufgrund von Internalisierung und anschließender lysosomaler Degradation zu einer Abnahme des NKG2D-Rezeptors an der Oberfläche und somit zu einer reduzierten NKG2D-vermittelten Zytotoxizität (Abb. 4) (Groh et al., 2002; Coudert et al., 2005; Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005; Song et al., 2006). Lösliche NKG2D-Liganden können im Serum von vielen Tumorpatienten nachgewiesen werden (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002; Salih et al., 2003). Die Generierung von löslichem MICA/B (sMICA/B) oder löslichen ULBPs (sULBPs) durch die Tumorzelle - dieser Vorgang wird auch als Shedding bezeichnet - erfolgt hierbei mit Hilfe einer Metalloprotease (Salih et al., 2006; Waldhauer & Steinle, 2006).

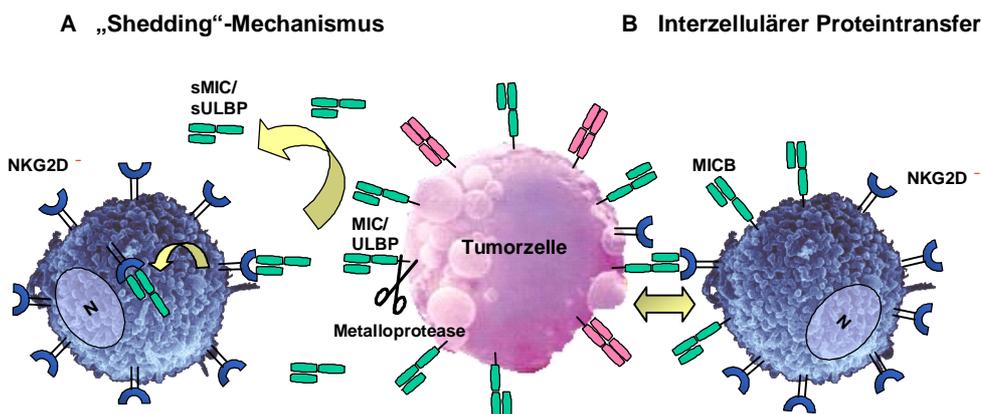


Abbildung 4: Mechanismen der Immunevasion NKG2D-Liganden tragender Tumorzellen. In dieser Abbildung sind zwei unterschiedliche Modelle dargestellt, die eine reduzierte NK-Zell- bzw. CTL-Aktivität nach Anreicherung von NKG2D-Liganden in der zytotoxischen Synapse erklären können. **A** Beim Shedding wird membrangebundenes MICA durch eine Metalloprotease von der Oberfläche der Tumorzelle abgespalten. Die löslichen MIC- bzw. ULBP-Fragmente (sMIC / sULBP) bewirken nach Bindung an den NKG2D-Rezeptor dessen Internalisierung. **B** Ein bidirektionaler Proteintransfer von aktivierendem NKG2D-Rezeptor und seinem Liganden MICB nach Ausbildung der zytotoxischen NK-Zell Immunsynapse kann ebenfalls zu einer herabgesetzten zytotoxischen Aktivität führen.

Eine Behandlung von Tumorpatienten mit einem Anti-CTLA-4 Antikörper oder durch Vakzinierung mit letal bestrahlten, autologen Tumorzellen führt interessanter Weise zu einem erhöhten Titer von Anti-MICA Antikörpern (Jinushi et al., 2006). Diese humorale Immunantwort führt wiederum zu einer Reduktion von im Blut zirkulierendem sMICA und somit zu einer verbesserten NK-Zell- bzw. CTL-Zytotoxizität, und somit zu einer effizienteren Tumoreliminierung (Jinushi et al., 2006). In einigen Tumorpatienten bewirkt sMICA sogar die selektive Expansion von $CD4^+$ $NKG2D^+$ T-Zellen, die im Gegensatz zu

CTLs in Gegenwart des sMICA keine herabgesetzte NKG2D-Expression zeigen (Groh et al., 2006).

Nach NKG2D-Stimulation beginnt diese Zellpopulation zu proliferieren und sezerniert den Apoptose induzierenden Faktor CD95L (FasL), was die Expansion der CD4⁺ NKG2D⁺ T-Zellen, die Arretierung der CD4⁺ NKG2D⁻ T-Zellen und CD8⁺ NKG2D⁺ T-Zellen zur Folge hat (Groh et al., 2006).

Während das Vorhandensein von löslichem MICA/B bei der Bekämpfung von Tumoren eher nachteilig zu sein scheint, besitzt es bei Schwangerschaften hingegen eine positive Funktion. Hier kann eine sMICA-vermittelte Reduktion des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen im maternalen Blutkreislauf den Fötus vor einem NKG2D-abhängigen Angriff schützen (Mincheva-Nilsson et al., 2006). Während der Interaktion von NKG2D und dem Liganden MICB an der immunologischen Synapse der NK-Zelle konnte sogar ein Proteintransfer von Rezeptor und Ligand nachgewiesen werden, der ebenfalls zu einer verringerten Aktivität der NK-Zelle führt (Abb. 4) (Roda-Navarro et al., 2006; Roda-Navarro & Reyburn, 2007).

Neben dem Shedding und dem bidirektionalen Transfer von Proteinen sezernieren Tumorzellen auch TGFβ1, das die Expression des NKG2D-Rezeptors negativ reguliert und somit ebenfalls die NKG2D-vermittelte Zellyse beeinträchtigt (Castriconi et al., 2003; Lee et al., 2004).

Vor kurzem gelang es NKG2D-defiziente Mäuse zu züchten. In der Studie von Guerra und Kollegen (2008) konnte somit zum ersten Mal auch auf genetischer Basis ein direkter Zusammenhang zwischen dem NKG2D-Rezeptor und einer effektiven Tumorimmunantwort bewiesen werden. Eine genaue Charakterisierung dieser Mäuse kam zu dem Ergebnis, dass eine NKG2D-Defizienz zwar zu keinem vollständigen Verlust der NK-Zell-Funktionen führt. Allerdings wird durch das Fehlen von NKG2D auf Immunzellen sowohl eine spontane epitheliale als auch lymphoide Tumorentstehung begünstigt (Guerra et al., 2008; Ljunggren, 2008).

1.7.4 NKG2D und Autoimmunität

Ein charakteristisches Merkmal von Autoimmunerkrankungen ist der selektive Angriff einer Population autoreaktiver Immunzellen auf einen Zelltyp, ein Gewebe oder ein Organ. Dies trifft bei Typ I Diabetes, der Zöliakie und bei RA zu. Neue Studien zeigen, dass eine Fehlregulation von NKG2D-Liganden im Gewebe und die anschließende Erkennung durch NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen ebenfalls zu der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung führen können.

Bei der Zöliakie handelt es sich um eine durch Gluten induzierte Entzündung des Darms. Diese führt zur Zerstörung des Dünndarmepithels infolge sowohl angeborener als

auch adaptiver Immunantwort (Hüe et al., 2004). Aufgrund der Entzündungsreaktion im Dünndarm werden vermehrt proinflammatorische Zytokine sezerniert, darunter auch IL-15. Dieses Zytokin bewirkt wiederum einen Anstieg der NKG2D-Expression auf intraepithelialen Lymphozyten (IEL) (Meresse et al., 2004). MICA, das auf epithelialen Zellen zwar konstitutiv, aber in geringen Mengen exprimiert wird, wird in Zöliakie-Patienten stark hochreguliert. Schließlich führt die Interaktion zwischen MICA-exprimierenden Epithelzellen und den NKG2D⁺ IEL zur Zerstörung des Darmgewebes (Martin-Pagola et al., 2003; Stepniak & Koning, 2006).

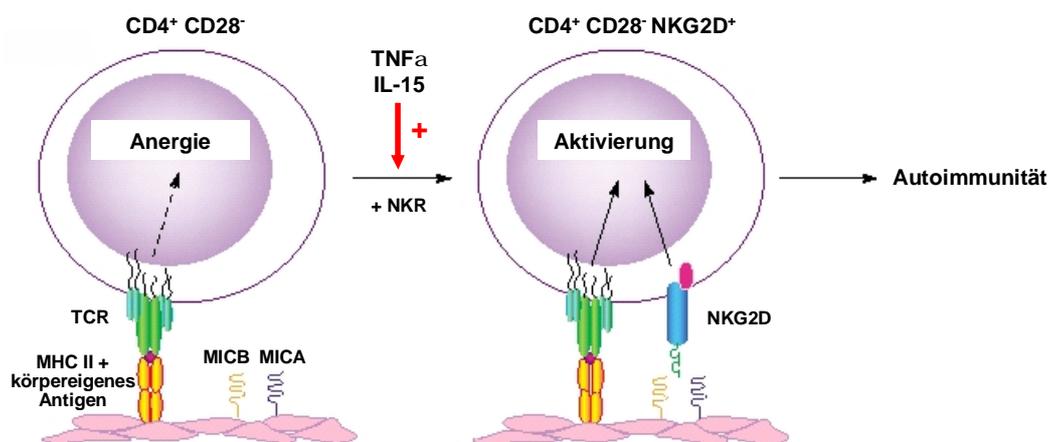


Abbildung 5: Die Rolle des alternativen kostimulatorischen Rezeptors NKG2D bei der Entstehung von Autoimmunität. Potentiell autoreaktive CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ CD28⁻) verfallen in der Regel ohne ein kostimulatorisches Signal über CD28 in einen Zustand der Anergie. Kommt es aber aufgrund von Entzündungsfaktoren (z.B. TNF α , IL-15) im Gewebe oder durch einen natürlichen Alterungsprozess der CD4⁺ T-Zellen zur Expression alternativer kostimulatorischer Rezeptoren wie NKG2D, entsteht bei gleichzeitiger stressinduzierter Expression von NKG2D-Liganden auf dem Gewebe eine Autoimmunreaktion. Abkürzungen: TCR: T-Zell Rezeptor; NKR: Natürliche Killer Zell Rezeptoren; TNF: Tumor Nekrose Faktor; IL: Interleukin. (Modifizierte Abbildung nach Snyder et al., 2004)

Auch bei der Ausbildung von RA scheinen der NKG2D-Rezeptor und seine Liganden eine Rolle zu spielen (Caillat-Zucman, 2006). Die Pathogenese der RA ist durch eine Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, und der Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Leukozyten im synovialen Gewebe gekennzeichnet. Dieser Vorgang führt letztendlich zur Zerstörung des Knorpels und des Knochens (Goronzy & Weyand, 2004). Eine erhöhte Konzentration an TNF α und IL-15 im Serum und in den entzündeten Gelenken ist bei Rheuma-Patienten charakteristisch (Groh et al., 2003). Die Sekretion der Zytokine induziert bei einer CD4⁺ CD28⁻ T-Zellpopulation die Expression von NKG2D, gleichzeitig findet im synovialen Gewebe eine verstärkte MICA/B Expression statt (Abb. 5). Dies führt schließlich zur Aktivierung der autoreaktiven CD4⁺ CD28⁻ T-Zellpopulation, die das synoviale Gewebe infiltrieren (Schmidt et al., 1996a; Schmidt et al., 1996b; Martens et al., 1997).

Typ I Diabetes mellitus (T1DM) ist eine weitere Autoimmunerkrankung, für deren Pathogenese die Interaktion von NKG2D und seinen Liganden eine Rolle zu spielen scheint. Die Erkrankung ist durch die Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen durch autoreaktive T-Zellen gekennzeichnet. Nicht obese diabetische (NOD) Mäuse mit einem Defekt in NK-Zell vermittelten Immunfunktionen stellen ein typisches Modellsystem für die Untersuchung der T1DM dar (Ogasawara et al., 2004). In diesen Mäusen konnte eine RAE-1 Expression im Gewebe und eine Rekrutierung NKG2D⁺ autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen in den Pankreas festgestellt werden. In einer Diabetes-Studie mit NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Ausbruch der Erkrankung durch die Behandlung von prädiabetischen Mäusen mit einem neutralisierenden Anti-NKG2D Antikörper komplett verhindert werden kann (Ogasawara et al., 2004).

All diese Studien konnten zeigen, dass der NKG2D-Rezeptor bei sämtlichen Erkrankungen des Humansystems von außerordentlicher Bedeutung ist. Somit könnte er zu einem Erfolg versprechenden Zielantigen weiterer therapeutischer Entwicklungen bei Autoimmunerkrankungen werden.

1.7.5 Aktuelle therapeutische Ansätze

Die Tatsache, dass der Rezeptor NKG2D bei so vielen unterschiedlichen Erkrankungen eine besondere Funktion einnimmt, macht ihn zu einem wichtigen Zielantigen neuer therapeutischer Ansätze sowohl für Tumorerkrankungen als auch für Autoimmunerkrankungen.

In einem Mausmodell mit inokulierten humanen Gliomazellen konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Vakzinierung mit bestrahlten Tumorzellen, die zuvor mit einer Adenovirus-vermittelten Plasmidübertragung zu einer MICA-Überexpression angeregt wurden, zu einer schützenden Immunantwort gegenüber den Wildtyp-Tumorzellen führt (Friese et al., 2003). Humane Gliomazellen sind dafür bekannt, dass sie nur eine geringe Menge an NKG2D-Liganden an ihrer Oberfläche exprimieren und somit eine unzureichende Tumor-Immunantwort induzieren. Erst durch den Einsatz unschädlicher MICA-überexprimierender Tumorzellen kann eine effektive Immunantwort eingeleitet werden (Friese et al., 2003). Eine weitere MICA-vermittelte Immuntherapie stellt der Einsatz von MICA-mimikrierenden Peptiden bei Autoimmunerkrankungen dar. Hier wurden basierend auf Kristallstrukturanalysen des NKG2D-MICA-Komplexes kurze Peptide synthetisch hergestellt, welche den funktionellen α 1- und α 2-Domänen des MICA ähnlich sind. Der Einsatz dieser kurzen löslichen Peptide in einem Concanavalin A-induzierten autoimmunen Hepatitis-Modell der Maus führte zu einem inhibitorischen Effekt gegenüber autoreaktiven Immunzellen, die an der Zerstörung der Leber beteiligt sind (Zhang et al., 2005). In einer anderen Studie, in der BALB/c-Mäuse mit rekombinantem

löslichem MICA immunisiert wurden, konnte hingegen gezeigt werden, dass das MICA Antigen die Proliferation von T-Zellen und die Zell-vermittelte Zytotoxizität stimuliert (Zhang & Stastny, 2006).

Ein DNA-Vakzinierungsmodell, in dem BALB/c-Mäuse mit einer Kombination aus Survivin und NKG2D-Ligand H60 mittels abgeschwächten *Salmonella typhimurium*-Stämmen oral immunisiert wurden, konnten die Mäuse sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch vor einer letalen Tumorentwicklung geschützt werden. Survivin ist ein Inhibitor der Apoptose und wird bei nahezu allen Tumoren überexprimiert. Der durch das Kombinationsvakzin erzielte Antitumor-Effekt beruht hierbei auf einer verstärkten Aktivierung von NK-Zellen und CTL (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2006).

Ein weiterer Therapie-Ansatz basiert auf der Entwicklung eines bispezifischen Proteins bestehend aus dem NKG2D-Liganden ULBP-2 und BB4. Während ULBP-2 hierbei an den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D bindet, bindet BB4 an CD138, das bei einer Reihe von malignen Tumoren überexprimiert vorliegt. Der Einsatz dieses bispezifischen Proteins hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Antitumor-Effekt gezeigt (von Strandmann et al., 2006).

Eine weitere Studie schlägt den Einsatz von chimären NKG2D-Rezeptor tragenden T-Zellen als Immuntherapie bei Eierstockkrebs vor. Hierbei wurde das NKG2D-Protein mit der zytoplasmatischen Region der CD3 ζ -Kette fusioniert. Dieses Konstrukt wurde in humane und murine CD8⁺ T-Zellen, die zuvor aus Tumor-Patienten bzw. –Mäusen isoliert worden waren, transferiert (Barber et al., 2007). Eine Behandlung mit diesen chimären NKG2D T-Zellen führte in Mäusen zur Entwicklung einer Anti-Tumor Immunität und somit sogar zu einer Langzeitwirkung gegen Tumorbildung (Barber et al., 2008).

Auch die Entwicklung Antikörper-basierter Therapien scheint Erfolg versprechend zu sein, wie eine Studie im T1DM-Mausmodell zeigt. Hier konnten NOD-Mäuse durch den Einsatz eines blockierenden Anti-murin NKG2D Antikörpers (CX5) selbst noch in einem späten Diabetes-Stadium kuriert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Antikörper die Expansion autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen im Pankreas unterdrückt, indem er auf diesen Zellen eine Bindung des NKG2D-Rezeptors an den Liganden RAE-1 auf Zellen des Pankreas verhindert (Ogasawara et al., 2004).

1.8 Antikörper: Struktur und Funktionalität

Antikörper sind zentrale Bestandteile der humoralen Immunantwort höherer Wirbeltiere. Man bezeichnet Antikörper auch als Immunglobuline (Ig), die im Organismus als Reaktion auf körperfremde Stoffe, sogenannte Antigene, von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, gebildet werden.

In der Regel sind Immunglobuline aus insgesamt vier Polypeptidketten aufgebaut und besitzen ein Molekulargewicht von 150 kDa (Ausnahmen: IgM und IgA). Sie bestehen jeweils aus zwei leichten Ketten (L-Kette), mit je 25 kDa, und zwei schweren Ketten (H-Kette), mit je 50 kDa. Bei den leichten Ketten gibt es lediglich zwei Typen, die man als Lambda (λ -) und Kappa (κ -) Ketten bezeichnet. Im Gegensatz dazu gibt es fünf Hauptklassen von schweren Ketten (μ , δ , γ , α und ϵ). Diese fünf verschiedenen Immunglobulinklassen IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α) und IgE (ϵ) bestimmen zugleich die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls.

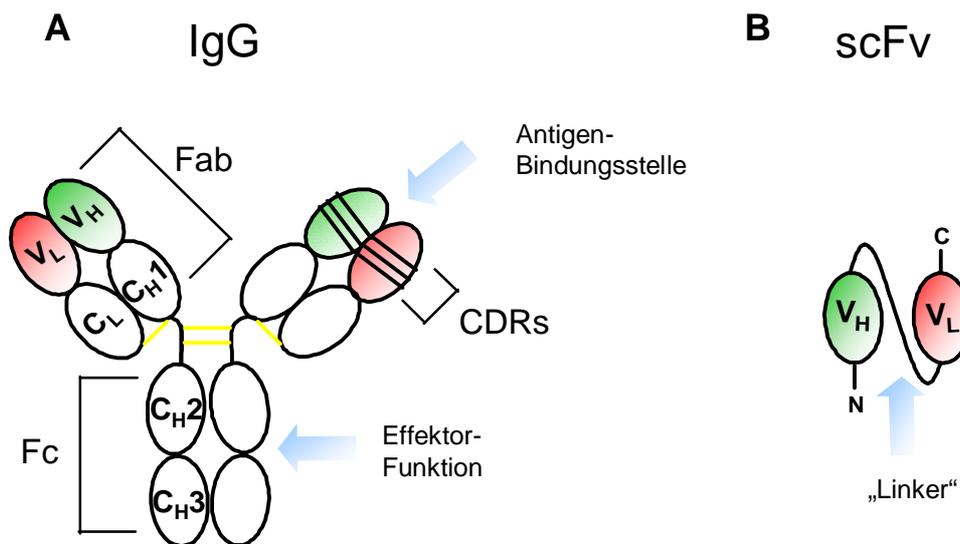


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines humanen Immunglobulins (IgG) (A) und eines scFv-Fragmentes (B). Abkürzungen: C_L , $C_{H1-C_{H3}}$: konstante Regionen; V_L : Variable Region der leichten Kette; V_H : Variable Region der schweren Kette; Fab: Antigenbindungsstelle (Fragment antigen binding); Fc: Effektorfunktionen (Fragment crystallizable); CDR: hypervariable Domänen (Complementarity Determining Regions); Linker: Peptidverbindung zur Verknüpfung von V_H und V_L ; scFv: single chain variable Fragment; Disulfidbrücken (—); N: N-terminal; C: C-terminal.

Die leichten Ketten bestehen aus jeweils zwei Unterregionen, einer variablen Domäne (V_L) am aminoterminalen Ende und einer konstanten Domäne (C_L) am carboxyterminalen Ende. Die schweren Ketten besitzen ebenfalls eine aminoterminal variable Domäne (V_H), jedoch beispielsweise bei humanem IgG drei konstante Domänen (CH_1 , CH_2 und CH_3). Die C_L -Domäne der leichten Ketten ist über Disulfidbrücken kovalent mit der CH_1 -Domäne der schweren Ketten verbunden. Zwei weitere Disulfidbrücken zwischen den konstanten Domänen CH_1 und CH_2 bilden die sogenannte

hing-Region (Gelenkregion) aus, die den Fc- mit dem Fab-Teil verbindet. Auf diese Weise entsteht ein Molekülkomplex mit einer charakteristischen Y-förmigen Struktur (Abb. 6). Die beiden Fab-Fragmente (Fragment antigen binding), welche die Arme des Antikörpermoleküls bilden, besitzen antigenbindende Aktivität. Der Fc-Teil (Fragment crystallizable), von dem beobachtet wurde, dass er leicht zu kristallisieren ist, vermittelt hingegen die Effektorfunktion des Antikörpers.

Die Spezifität der Bindung eines Antikörpers wird nur von einem bestimmten Teil des Gesamtmoleküls vermittelt. Diese antigenbindenden Bereiche bezeichnet man als Fv-Region, von der jedes IgG zwei identische besitzt. Sie setzt sich aus einer variablen Domäne der leichten Kette (VL) und einer variablen Domäne der schweren Kette (VH) zusammen. Innerhalb jeder variablen Region befinden sich drei kurze Peptidabschnitte von ca. 5 bis 20 Aminosäuren, die eine viel höhere Variabilität aufweisen als die übrigen Abschnitte. Da diese sechs hypervariablen Bereiche die Bindungsstelle für Antigene bilden und aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine räumliche Struktur festlegen, die für ein spezielles Antigen komplementär ist, nennt man sie auch komplementaritätsbestimmende Regionen (Complementarity Determining Regions, CDRs). Die Abschnitte zwischen diesen CDRs (CDR1, CDR2, CDR3) bezeichnet man als Gerüstregionen (Framework Regions, FRs), die üblicherweise der Stabilisierung der räumlichen Struktur der hypervariablen Bereiche dienen. In Abb. 6 sind ein IgG und ein davon abgeleitetes Antikörperfragment schematisch dargestellt. Bei einem single chain Fv-Antikörperfragment (scFv-Fragment) sind die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette (VH und VL) über eine (G4S)₃-Linkersequenz, einem sogenannten künstlichen Peptidlinker, miteinander verbunden.

1.9 Generierung und Entwicklung therapeutischer Antikörper

1.9.1 Humanisierung von Antikörpern mittels Phagen-Display

Seit etwa 24 Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der gentechnologischen Herstellung von rekombinanten Antikörpern. Das Prinzip zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die sogenannte Hybridom-Technologie, wurde Mitte der siebziger Jahre von Milstein und Köhler entwickelt (Köhler & Milstein, 1975). Diese Methode erfordert zuerst die Immunisierung eines Versuchstiers (z.B. Maus) mit dem jeweiligen Antigen. Nach Entwicklung einer Immunantwort werden die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten aus der Milz isoliert und für die *in vitro*-Kultivierung mit Plasmamyelomzellen fusioniert. Die Abkömmlinge bzw. Klone dieser Hybridomzellen produzieren Antikörper mit einer definierten Spezifität. Daher bezeichnet man sie auch als monoklonale Antikörper (mAk).

Eine Therapie mit diesen mAk ist jedoch problematisch, da der menschliche Organismus innerhalb weniger Tage nach Verabreichung des Antikörpers humane Anti-Maus Antikörper bilden würde. Diese Reaktion bezeichnet man als HAMA (Humane Anti-Maus-Antikörper) Immunantwort (DeNardo et al., 2003a; DeNardo et al., 2003b; de Bono et al., 2004), die eine Neutralisierung und rasche Ausscheidung des therapeutischen Antikörpers zur Folge hat (Hwang & Foote, 2005) und zu klinischen Komplikationen wie Nierenversagen durch die Ausbildung von Immunkomplexen führen kann.

Um eine Immunantwort der Patienten gegen immuntherapeutische Antikörper zu minimieren, wurden nicht humane Anteile der Antikörper durch humane Anteile ersetzt. Durch Austausch der konstanten Bereiche von schwerer und leichter Kette (chimäre Antikörper) und eine nachfolgende Humanisierung der FR-Regionen konnte eine deutliche Reduzierung der Immunogenizität erreicht werden. Seit Beginn der neunziger Jahre konnten vollständig humane Antikörper mittels transgener Mäuse, die ein inseriertes humanes Antikörpergen-Repertoire besaßen, gewonnen werden (Little et al., 2000). Seit einigen Jahren werden nun neue Methoden zur Humanisierung und Selektion von humanen Antikörpern entwickelt, die nicht auf der Immunisierung von Versuchstieren beruhen.

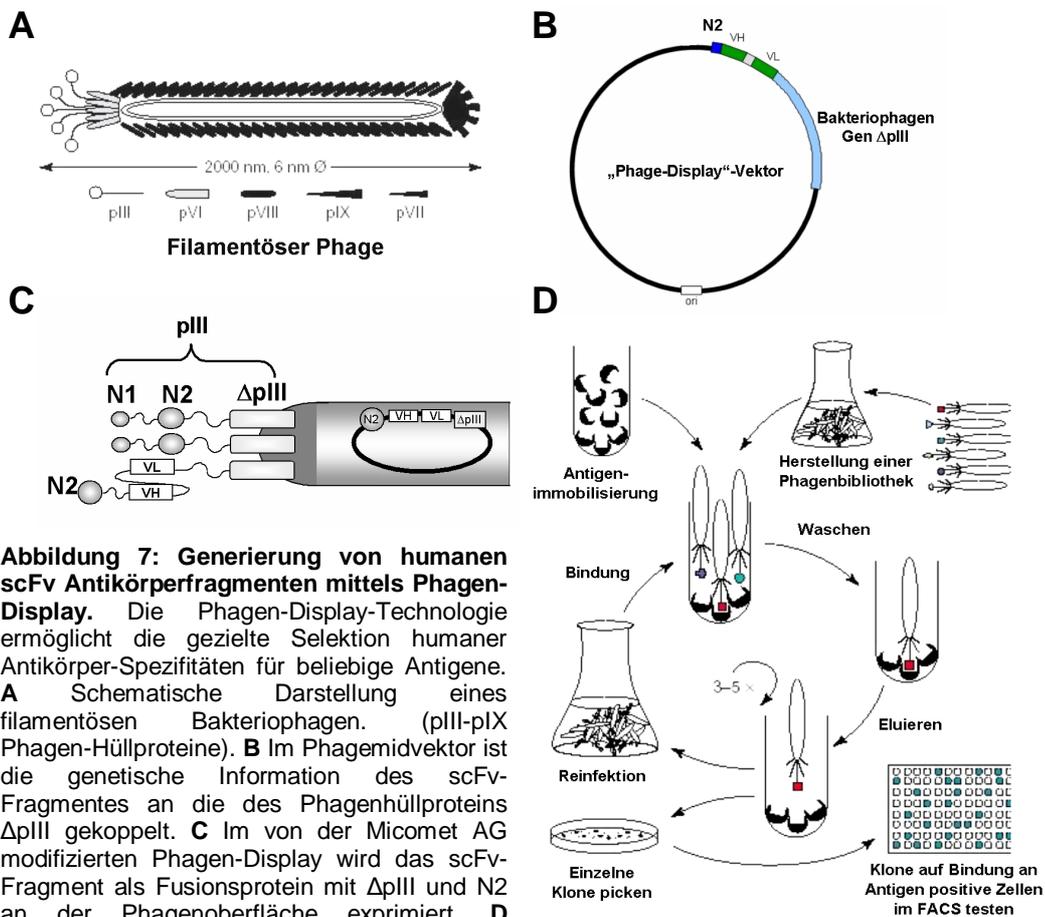


Abbildung 7: Generierung von humanen scFv Antikörperfragmenten mittels Phagen-Display. Die Phagen-Display-Technologie ermöglicht die gezielte Selektion humaner Antikörper-Spezifitäten für beliebige Antigene. **A** Schematische Darstellung eines filamentösen Bakteriophagen. (pIII-pIX Phagen-Hüllproteine). **B** Im Phagemidvektor ist die genetische Information des scFv-Fragmentes an die des Phagenhüllproteins $\Delta pIII$ gekoppelt. **C** Im von der Micomet AG modifizierten Phagen-Display wird das scFv-Fragment als Fusionsprotein mit $\Delta pIII$ und N2 an der Phagenoberfläche exprimiert. **D** Schematische Darstellung der Phagen-Display-Methode. (Modifizierte Abbildung nach Konthur & Walter, 2002)

Eine innovative Methode zur schnellen und erfolgreichen Humanisierung von monoklonalen Maus-Antikörpern stellt das Phagen-Display dar. Hierbei werden scFv-Antikörperfragmente in Kombination mit dem Phagenhüllprotein $\Delta pIII$ auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert (McCafferty et al., 1990; Barbas et al., 1991) (Abb. 7A/B/C). Im folgenden Selektionsprozess, der in Anlehnung an die Goldsuche auch Panning genannt wird, werden Antikörperfragmente mit bestimmten Bindungseigenschaften über sich wiederholende Waschprozesse ähnlich dem Goldwaschen herausortiert (Abb. 7D). Bei diesem Prozess werden die Antikörperfragment-tragenden Phagen mit dem Antigen, gegen das sich die Spezifität richten soll, inkubiert. Das Antigen kann hierfür auf einer Mikrotiterplatte oder indirekt über Biotin-Streptavidin an magnetischen Partikeln (Hawkins et al., 1992) immobilisiert werden. Diese Technik ermöglicht sogar die Isolierung humaner Antikörper gegen toxische oder stark pathogene Antigene (Hoogenboom & Chames, 2000).

Die Wahrscheinlichkeit, dass aus kombinatorischen Phagen-Display-Bibliotheken hoch affine Antikörper generiert werden, ist gering. Eine hohe Affinität der Antikörper bzw. scFv ist jedoch für eine gute Pharmakokinetik von Vorteil, da dies eine reduzierte Dosierung, Toxizität und eine Senkung der Kosten während eines Therapieeinsatzes zur Folge hat. Aufgrund dieser Tatsache wird im Anschluss meist eine *in vitro* Affinitätsmaturierung durchgeführt (Hoet et al., 2005). Bei diesem Verfahren wird mit Hilfe des Phagen-Display und schrittweiser Selektion die Antigenkonzentration stetig reduziert und dadurch der Selektionsdruck auf die bindenden scFv-Phagen zunehmend erhöht. Bei niedrigen Antigenkonzentrationen besitzen hoch affine scFv gegenüber niedrig affinen scFv einen klaren Selektionsvorteil, so dass am Ende der Affinitätsmaturierung in der Regel mehr hoch affine scFv isoliert werden können.

1.9.2 Therapeutische Antikörper

Die heutzutage verwendeten therapeutischen Antikörper sind gentechnologisch hergestellte Moleküle, die entwickelt wurden, um eine hohe Spezifität und Funktionalität zu garantieren. Der enorme Fortschritt in der Entwicklung und Generierung von rekombinanten Antikörpern hat dazu beigetragen, dass derzeit mehr als 30 Prozent aller Proteine, die sich in der klinischen Erprobungsphase befinden, Antikörper sind (Dübel et al., 2004). Einer Therapie mit Antikörpern können folgende unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde liegen (Schrama et al., 2006a):

- Blockade von Rezeptor-Liganden-Interaktion
- Rekrutierung von Immunzellen
- Gezielter Transport von Wirkstoffen

- Immunmodulation
- Apoptose-Induktion
- ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy)

Blockierende, therapeutische Antikörper zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder anderen löslichen bzw. membranständigen Modulatoren an ihre entsprechenden Rezeptoren verhindern. Dies kann der Antikörper entweder durch seine Bindung an einen löslichen Faktor oder an einen Rezeptor bewerkstelligen. Dieses Wirkprinzip besitzt z.B. Humira® (Adalimumab), der als Neutralisierer von TNF α zur Therapie von RA zugelassen ist (Weisman et al., 2003), oder Zenapax® (Daclizumab), der an die α -Kette des IL-2 Rezeptorkomplexes aktivierter T-Zellen bindet und somit einer Abstoßungsreaktion nach einer Organtransplantation entgegen wirkt (Hershberger et al., 2005) (Tab. 4). Antikörper können aber auch aufgrund ihrer Fähigkeit zur Rekrutierung von immunologischen Effektorzellen wirken. Hierbei wird die natürliche Effektorfunktion von Antikörpern, über ihren Fc-Teil an Fc-Rezeptoren und Komponenten des Komplementsystems zu binden, ausgenutzt. Einige in der Tumorthherapie eingesetzte Antikörper wirken demnach über die Mechanismen der komplementvermittelten Zytotoxizität (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC) und der ADCC. Klinisch zugelassene Antikörper mit diesem Wirkprinzip sind z.B. das zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzte Herceptin® (Trastuzumab) oder Rituxan® (Rituximab), das in der Therapie von B-Zell-Lymphomen Anwendung findet (Tab. 4) (Smith, 2003).

Es wurden für therapeutische Zwecke auch Antikörper entwickelt, die als Träger bestimmter Effektormoleküle fungieren. So werden verschiedene Antikörper an Enzyme, Toxine, Chemotherapeutika, Radioisotope oder Zytokine gekoppelt und auf diese Weise für den zielgerichteten Transport dieser Substanzen genutzt. Die beiden zur Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassenen Antikörper Zevalin® und Bexxar® sind z.B. mit einem Radioisotop konjugiert. Zur Zeit ist Mylotarg®, ein gegen CD33 gerichteter humanisierter Antikörper, der einzige zur Behandlung von akuter myeloider Leukämie zugelassene Antikörper, der mit der zytotoxischen Substanz Calicheamicin gekoppelt ist (Carter, 2006; Schrama et al., 2006a).

Durch den Einsatz von Antikörper-Zytokin-Konjugaten oder bispezifischen Antikörperfragmenten kann die Immunantwort gegen einen Tumor positiv moduliert werden. Fusionsproteine aus Antikörper und Liganden, wie z.B. FasL, können nach ihrer spezifischen Bindung an das Antigen sowohl die gebundene Zielzelle als auch benachbarte Zellen durch die Induktion von Apoptose eliminieren (Schrama et al., 2006a).

Tabelle 4: Übersicht der auf dem Pharmamarkt zugelassenen therapeutischen Antikörper (Carter, 2006; Schrama et al., 2006a)

Antikörper	Handelsname	Ziel-Antigen	Indikation
Abciximab	ReoPro®	GP1Ib/IIIa Fibrinogenrezeptor	Angina pectoris
Adalimumab	Humira®	TNF α	Rheumatoide Arthritis
Alemtuzumab	Campath®	CD52	Chronische Lymphatische Leukämie
Bevacizumab	Avastin®	VEGF	Darmkrebs
Basiliximab	Simulect®	IL-2 Rezeptor	Organtransplantation
Cetuximab	Erbitux®	EGFR	Darmkrebs
Daclizumab	Zenapax®	IL-2 Rezeptor	Organ-Transplantation
Efalizumab	Raptiva®	CD11a	Psoriasis
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	CD33	Akute myeloide Leukämie
Ibritmomab tiuxetan	Zevalin®	CD20	Non-Hodgkin Lymphom Radioimmuntherapeutikum
Infliximab	Remicade®	TNF α	Rheumatoide Arthritis
Muromomab	Orthoclone OKT3®	CD3	Organtransplantation
Natalizumab	Tysabri®	α_4 -Untereinheit von $\alpha_4\beta_1$ -Integrin und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin	Multiple Sklerose
Omalizumab	Xolair®	IgE	Allergien
Palivizumab	Synagis®	RSV	Prävention von RS-Virusinfektion
Rituximab	Rituxan®	CD20	B-Zell Lymphom
Tositumomab-I131	Bexxar®	CD20	Non-Hodgkin Lymphom Radioimmuntherapeutikum
Trastuzumab	Herceptin®	HER-2	Brustkrebs

Die Methode des ADEPT ermöglicht die Ausweitung eines Antitumoreffektes auf benachbarte Tumorzellen, die möglicherweise nicht die entsprechenden Zielantigene tragen. Hierbei wird eine nur gering toxische Vorstufe eines Medikamentes verabreicht, die durch ein Enzym, das von einem tumorspezifischen Antikörper transportiert wird, an der Tumorzelle in eine aktive toxische Substanz umgewandelt wird. In Tabelle 4 sind alle derzeit zugelassenen therapeutischen Antikörper aufgelistet (Brekke & Sandlie, 2003; Reichert et al., 2005; Carter, 2006; Schrama et al., 2006a).

1.10 Problemstellung und Zielsetzung

Immer mehr Studien legen den Verdacht nahe, dass der NKG2D-Rezeptor und seine Liganden bei der Entstehung vieler Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Durch Inhibierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion mit Hilfe eines neutralisierenden Antikörpers konnte der Krankheitsverlauf unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen wie T1DM (NOD-Mäuse), Multiple Sklerose (*in vitro*) und Colitis (SCID-Mäuse) gestoppt oder zumindest gemildert werden (Ogasawara et al., 2004; Kjellek et al., 2007; Saikali et al., 2007; Lopez-Larrea et al., 2008). Neben den in artifiziellen Mausmodellen erlangten Informationen sind aber vor allem Ergebnisse aus dem Humansystem von besonderer Wichtigkeit. Diese untermauern die zentrale Rolle des NKG2D-Rezeptors während der Entwicklung humaner Autoimmunerkrankungen, wie dies z.B. für die Zöliakie (Martin-

Pagola et al., 2003; Hübner et al., 2004; Meresse et al., 2004) und für RA (Groh et al., 2003; Goronzy & Weyand, 2004; Caillat-Zucman, 2006) gezeigt wurde.

Die Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass ein immuntherapeutischer Ansatz, in dem ein Antikörper die Fehlfunktion des NKG2D-Rezeptors unterbindet, auch für den Menschen eine mögliche Behandlungsmethode bei autoimmunen Erkrankungen darstellen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es daher, humane Antikörper zu generieren, welche die Fähigkeit besitzen sollten, die biologische Aktivität des NKG2D-Rezeptors zu neutralisieren. Die Funktionalität der Antikörper sollte hierbei ausschließlich auf humanen NK-Zellen getestet werden, da hier der NKG2D-Rezeptor im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen eine direkte Aktivierung der Zellen einleiten kann. Dazu sollten zunächst aus Vorarbeiten identifizierte monoklonale Anti-hNKG2D Maus-Antikörper hinsichtlich ihrer Bindungs- bzw. Neutralisierungseigenschaften und ihrer Verwendbarkeit für verschiedene Detektionsmethoden charakterisiert werden. Weiterhin sollten in Bezug auf zu erwartende biologische Funktionen agonistische und antagonistische Bindungseigenschaften der Antikörper experimentell im FACS und im ⁵¹Cr-Freisetzung-Assay untersucht werden.

Um die Gefahr einer HAMA-Reaktion im Menschen so gering wie möglich zu halten, sollten die ursprünglich aus der Maus stammenden Antikörper humanisiert werden. Für die Humanisierung und die anschließende Selektion eines solchen Antikörpers sollte die Methode des Phagen-Display angewendet werden. Als Ausgangsformat für die Entwicklung eines humanen Antikörpers sollte dazu das scFv-Fragment gewählt werden.

Nach erfolgreicher Selektion eines geeigneten NKG2D-neutralisierenden Antikörpermoleküls sollte dessen Bindungsaffinität durch eine anschließende Affinitätsmaturierung gesteigert werden. Die aus der Affinitätsmaturierung resultierenden humanen Antikörper sollten *in vitro* hinsichtlich Antigenbindungsaffinität, Neutralisierungseffizienz, Stabilität und Internalisierung auf humanen NK-Zellen untersucht werden. Dazu sollte das scFv-Fragment zuvor durch Fusion mit einer humanen konstanten Immunglobulin-Domäne in ein vollständiges humanes IgG1-Antikörperformat konvertiert werden.

Um die Effizienz der neutralisierenden Antikörper genauer analysieren zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Konsequenzen einer hNKG2D-abhängigen Aktivierung zu untersuchen und mögliche Biomarker, die für eine NKG2D-vermittelte Immunantwort charakteristisch sind, zu etablieren. Hierzu sollten *ex vivo* angereicherte primäre NK-Zellen über lösliche Liganden stimuliert und Genaktivierungsprofile mittels Microarray erstellt werden.

2. Material

2.1 Geräte

Begasungsbrutschrank Heracell 240	Kendro
Biacore 2000	Biacore
Blot Module Xcell II	Invitrogen
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Kendro
Brutschrank Innova 4400 Schüttelinkubator	New Brunswick
Brutschrank Minitron Typ AI 72 Schüttelinkubator	Infors
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
ELISA-Leser	BioTek Instruments
ELISA-Waschgerät	Molecular Devices
FACS Calibur	Becton Dickinson
FACSort	Becton Dickinson
Festwinkelrotor GS-3	Kendro
Gammazähler	Perkin Elmer
Geldokumentationsgerät	Syngene
Gelgießstand	Bio-Rad
Gelkammern	Invitrogen
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	Leica
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge Rotina 46R	Hettich
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
Magnet zur Zellaufreinigung Dynal MPC-50	Invitrogen
PCR-Robocycler Gradient 96	Stratagene
PCR-Thermocycler	Peltier
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Proteinaufreinigungsgerät ÄKTAexplorer 100 Air	Amersham Bioscience
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HSP12	Kendro
Thermomixer/-block	Eppendorf
Waagen	Kern; Ohaus
Wasserbad	GFL
Wipptische	ELMI; Labortechnik Fräbel
Zellkulturzentrifugen	Kendro; Hettich

2.2 Laborbedarf

Acrylamid-Fertiggele NuPAGE 4-12% Bis-Tris	Invitrogen
Aufkonzentrierungsröhrchen Nanosep	PALL
Dialyseschläuche	Sigma
Einmalkanülen	Terumo
Einmalspritzen	Dispomed
Einwegskalpelle, steril	Ratiomed
ELISA-Platten	Nunc, Greiner
Elektroporierküvetten	Roth
Eppendorf Caps 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Micronic
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Gelfiltrationssäule HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule Sephadex G 25	GE Healthcare
Gewebekulturplatten, 96 Kammer, F-, V-, U-Form, steril	Greiner
Gewebekulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48-Kammer, steril	Becton Dickinson
HiTrap 5 ml Protein G HP-Säule	GE Healthcare
Mini Dialyse-Einheiten 10.000 MWCO	Pierce
Nalgene Filter, steril	Nunc
Ni-NTA Säulen	Qiagen
PBMC Isolation Falcons, Leucosep, 30 ml, steril	Greiner
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific
Polystyrene Rundboden Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson
Polystyrene Rollerflaschen	Becton Dickinson
Polystyrene Schüttelkolben, steril	Invitrogen
Protein G-Sepharose 4B	Sigma
PROSEP-Chelating I	Millipore
Säulengehäuse XK16/20	GE Healthcare
Schwammkissen für Westernblot	Invitrogen
Sensorchip CM5	Biacore
Sterilfilter 0,2 µm	PALL
Streptavidin beschichtete Platten	Nunc
Westernblotmembran Hyband-P PVDF Membrane	GE Healthcare
Zählkammer	Neubauer
Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
Zellkulturröhrchen 50 ml, 15 ml	Becton Dickinson

2.3 Kits

Amine Coupling Kit	Biacore
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson
Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II	Becton Dickinson
Cytometric Bead Array Human Inflammation Kit	Becton Dickinson
DuoSet ELISA-Kit human CCL-4/CCL-3	R&D Systems
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce
NK Cell Negative Isolation Kit	Invitrogen
Omniscript RT Kit	Qiagen
OptEIA Set Human GM-CSF	Becton Dickinson
pGEM-T Easy Vector System I	Promega
QIAfilter Plasmid Midi-Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SilverXpress Silver Staining Kit	Invitrogen

2.4 Puffer und Lösungen

1x PBS:	154 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4
ELISA-Waschpuffer:	1x PBS, 0,05% Tween-20	
FACS-Waschpuffer:	1x PBS, 1%FCS, 0,05% NaN ₃ oder 1x PBS, 3% FCS	
1x TAE:	40 mM Tris-Base 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA	pH 8
TBE:	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA	
TBS:	50 mM Tris 137 mM NaCl 2,7 mM KCl	pH 8

TBS-T: TBS, 0,05% Tween-20

Sämtliche Chemikalien, die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, wurden von Fluka, Merck, Sigma oder Roth in Analysequalität bezogen.

Puffer oder Lösungen, die nur bei einer bestimmten Methode zur Anwendung kamen, werden zusammen mit der entsprechenden Methode in Kapitel 3 beschrieben.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zelllinien

Name	Charakteristik	Herkunft
NKL	Humane natürliche Killer Lymphom-Zellen, die in Suspension unter Zugabe von humanem rek. IL-2 (200 U/ml) wachsen.	DKFZ Heidelberg (Arbeitsgruppe C. Watzl)
BaF/3-Transfektanten	Aus dem peripheren Blut der Maus etablierte pro B-Zelllinie, die in Gegenwart von murinem IL-3 in Suspension wächst, das die Zellen selbständig produzieren.	DKFZ Heidelberg (Arbeitsgruppe A. Cerwenka)
P815	Murine Mastozytomazellen, Fc-Rezeptor tragende Suspensions-Zelllinie.	DKFZ Heidelberg (Arbeitsgruppe A. Cerwenka)
CHO-human NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺	Chinesische Hamster Ovary-Zellen, die mit hNKG2D und hDAP10-DNA stabil transfiziert wurden.	Micromet (Arbeitsgruppen R. Kischel, R. Lutterbüse)
CHO-dhfr⁻	Chinesische Hamster Ovary-Zelllinie, der das Enzym Dehydrofolatreduktase fehlt.	DSMZ
HEK293-F	Ein Klon der Zelllinie HEK293 (Humane Embryonic Kidney Cells), der unter serumfreien Kulturbedingungen in Suspension wächst.	Invitrogen

2.5.2 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur

AAU (10x):	HEPES	26 g/l (0,1 M); pH 7,2	BIOMOL
	Adenosin	2,92 g/l (11 mM)	Sigma
	L-Alanosin	0,074 g/l (0,5 mM)	
	Uridin	2,4 g/l (10 mM)	Sigma

Ein Liter 10x AAU-Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm Filter), in sterile 50 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Erythrozyten-Lysepuffer:	8,29 g/l NH ₄ Cl (0,15 M)	pH 7,2-7,4
	1,00 g/l KHCO ₃ (10 mM)	
	37,2 mg/l Na ₂ EDTA (0,1 mM)	

Ein Liter Ammoniumchlorid-Lysepuffer mit EDTA wurde steril filtriert (0,2 µm Filter), in sterile 50 ml Röhrchen aliquotiert und bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Desoxycoformicin (dCF, Pentostatin; Nipent) (2mM)	Wyeth
dFCS (dialysiertes FCS)	Biochrom
EDTA	Biochrom
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom
Humanserum AB	PAA
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
Methotrexat (MTX) (0,5 mM)	Hexal
PBS-DULBECCO 1x w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom
Phenolrot	Biochrom
Rekombinantes (rek.) humanes IL-2 (Proleukin®)	Novartis
Trypsin	Biochrom
ultra pure Wasser, steril	Biochrom

FCS und dFCS wurden vor dem Einsatz in der Zellkultur für 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert (h.i).

2.5.3 Zellkulturmedien und Kultivierungsbedingungen

NKL:	RPMI 1640-Medium (Biochrom)	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
	20% FCS h.i.	100 ml
	rek. humanes IL-2 (10 ⁵ U/ml)	1,2 ml

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert und zwischen 2x 10⁵-1x 10⁶ Zellen/ml gesplittet. Für die Funktionalitätsstudien im ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay wurde Medium mit nur 10% FCS und 200 U/ml rek. humanem IL-2 verwendet (NKL-Medium*).

BaF/3 und P815:	RPMI 1640-Medium (Biochrom)	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
	10% FCS h.i.	50 ml

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert und zwischen 2x 10⁵-1x 10⁶ Zellen/ml gesplittet.

CHO-human NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺:	HyQ®PF CHO Liquid Soy (HyClone)	1 L
	L-Glutamin (200 mM)	10 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	10 ml
	Phenolrot	2 ml
	10x AAU	100 ml
	dCF (2 mM)	50 µl

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ in Gegenwart des Zytostatika dCF und 1x AAU im Brutschrank in Suspension kultiviert und zwischen 2x 10⁵-1x 10⁶ Zellen/ml gesplittet.

CHO-dhfr⁻:	HyQ®PF CHO Liquid Soy (HyClone)	1 L
	Nukleotide (200x)	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	10 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 µg/ml)	10 ml
	Phenolrot	2 ml

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank in Suspension kultiviert und zwischen 2x 10⁵-1x 10⁶ Zellen/ml gesplittet.

HEK293-F: Freestyle 293 Expressions Medium (Invitrogen)

Die Zellen wurden in Freestyle 293 Expressions Medium (Invitrogen) bei 37°C und 8% CO₂ unter leichtem Schütteln (100 rpm) kultiviert.

2.6 Bakterienkultur

2.6.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
TG1	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁻) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	Stratagene
XL1-Blue	endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
NovaBlue	EndA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tc ^r)]	Novagen

2.6.2 Kulturmedien

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton
0,5% Bacto-Hefeextrakt
340 mM NaCl
pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

LB-Platten: LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

SB-Medium: 1% MOPS
3% Bacto-Trypton
2% Bacto-Hefeextrakt
pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

2.6.3 Antibiotika

Carbenicillin (Roth)

Stocklösung: 100 mg/ml in 50% EtOH

Endkonzentration in Flüssigmedium 50 µg/ml und Festmedium 100 µg/ml

Tetracyclin (Fluka)

Stocklösung: 5 mg/ml in EtOH

Endkonzentration in Flüssigmedium 10 µg/ml

Kanamycin (Roth)

Stocklösung: 10 mg/ml in H₂O

Endkonzentration in Flüssigmedium 70 µg/ml

2.7 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

2.7.1 Enzyme und andere Reagenzien

Alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal</i> , CIP)	New England Biolabs
dNTP Mix (2mM)	Fermentas
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas
Primer p(dT) ₁₅ für cDNA-Synthese	Roche
Restriktionsenzyme (<i>BstEII</i> , <i>Sall</i> , <i>SpeI</i> , <i>XhoI</i> usw.)	Roche, New England Biolabs
RNase-Inhibitor	Roche
T4-DNA Ligase	Roche
T4-DNA Quick-Ligase	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Roche

2.7.2 DNA-, Proteinmarker und Ladepuffer

GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen
NuPAGE LDS Proben-Puffer (4x)	Invitrogen
Proteinmarker MultiMark	Invitrogen
6x Loading Dye	Fermentas

2.7.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München, Martinsried) bezogen.

Primer für semiquantitative RT-PCR Analysen:

Human IL-3_for	5'-CTTAAAAATCTCCTGCCATGTCTGC-3'
Human IL-3_rev	5'-CATTCTCAAGGGTTTTTCAGATAGAACG-3'
Human LIF_for	5'-TGGAAGTCGACAATGTTACAAGTGG-3'
Human LIF_rev	5'-TAAAGCAAGTCACAGTAGGGGATGG-3'
Human XCL-1_for	5'-TCTGACCTTGTACCTCTCTTTGATGG-3'
Human XCL-1_rev	5'-CTGTAACCTTGTGACTGATGTGTAAAG AACC-3'
Human IFN γ _for	5'-AAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGC-3'
Human IFN γ _rev	5'-CCTTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGC-3'
Human β -Aktin_for	5'-AGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCC-3'
Human β -Aktin_rev	5'-ATGCCAATCTCATCTTGTTTTCTGC-3'

Primer für „Screening“-PCR:

5'-upEco	5'-TTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'
3'-downPIII	5'-CGCTTACAATTTCCAGATCTGCG-3'

Primer zur Umklonierung der murinen VHs in den Phagen-Display-Vektor:

5'-6H7-VH-XhoI	5'-ACTGCACTCGAGTCAGGACCTGGCC TGGTGGCGC-3'
5'-6E5-VH-XhoI	5'-ACTGCACTCGAGTCAGGACCTGGCC TAGTGCAGCC-3'
3'-MuVH-BstEII	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTT GGCCCCAG-3'

Primer zur Mutagenese der 6H7 mFR1/2/3 VH:

6H7_F27G_for	5'-GCACTGTCTCTGGGGGTTTACCTCG-3'
6H7_F27G_rev	5'-CGAGGTTAATGAACCCCCAGAGACAGTGC-3'
6H7_L29I_for	5'-GTCTCTGGGTTTTCAATAACCTCGTACGGTGTG-3'
6H7_L29I_rev	5'-CACACCGTACGAGGTTATTGAAAACCCAGAGAC-3'
6H7_T30S_for	5'-GGGTTTTTATTATCCTCGTACGGTGTGC-3'
6H7_T30S_rev	5'-GCACACCGTACGAGGATAATGAAAACCC-3'
6H7_L48I_for	5'-GGGTCTGGAGTGGATAGGAGTAATATGGGC-3'
6H7_L48I_rev	5'-GCCCATATTACTCCTATCCACTCCAGACCC-3'

6H7_L67V_for 5'-GCGCTCATGTCCAGAGTGAGCATCAGCAAAG-3'
6H7_L67V_rev 5'-CTTTGCTGATGCTCACTCTGGACATGAGCGC-3'

Primer für die schrittweise Humanisierung der 6H7 HHD2 VH:

F27G_for 5'-GCACTGTCTCTGGGGGCTCAATATCCTCGTACG-3'
F27G_rev 5'-CGTACGAGGATATTGAGCCCCCAGAGACAGTGC-3'

V67L_for 5'-GCGCTCATGTCCAGACTGACCATCAGCGTTGAC-3'
V67L_rev 5'-GTCAACGCTGATGGTCAGTCTGGACATGAGCGC-3'

T68S_for 5'-GCTCATGTCCAGAGTGCCATCAGCGTTGACA
CATCC-3'
T68S_rev 5'-GGATGTGTCAACGCTGATGGACACTCTGGACA
TGAGC-3'

V71K_for 5'-GAGTGACCATCAGCAAGGACACATCCAAGAACC-3'
V71K_rev 5'-GGTCTTGGATGTGTCCTTGCTGATGGTCACTC-3'

T73N_for 5'-CCATCAGCGTTGACAATTCCAAGAACCAAGT
TAGC-3'
T73N_rev 5'-GCTAACTTGGTTCTTGAATTGTCAACGCTG
ATGG-3'

N76S_for 5'-GACACATCCAAGAGCCAAGTTAGCTTAAAATTG-3'
N76S_rev 5'-CAATTTTAAGCTAACTTGGCTCTTGGATGTGTC-3'

S79F_for 5'-CCAAGAACCAAGTTTTCTTAAAATTGTCTAGTG-3'
S79F_rev 5'-CACTAGACAATTTTAAGAAAACCTTGGTTCTTGG-3'

L82M_for 5'-CCAAGTTAGCTTAAAATGTCTAGTGTGACAG
CTGC-3'
L82M_rev 5'-GCAGCTGTCACACTAGACATTTTAAAGCTAAC
TTGG-3'

S82aN_for 5'-GTTAGCTTAAAATTGAATAGTGTGACAGCTGC
TGG-3'

S82aN_rev 5'-CAGCAGCTGTCACACTATTCAATTTAAGCTAAC-3'

V89M_for 5'-GCTGCTGACACAGCCATGTACTACTGTGCCA
GAGG-3'

V89M_rev 5'-CCTCTGGCACAGTAGTACATGGCTGTGTCAG
CAGC-3'

Primer zur Umklonierung der humanen scFv in ein IgG1 Antikörperformat:**I) VHs**

5'-NKhumVH**Bsu361*** 5'-TTCTCT**CCTTAGG**TGTCCACTCCCAGGTGCAGCT
GCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGG-3'

3'-Linker Seq 5'-AGCTCAGAACCACCACCACCGGA-3'

II) VLs

5'-VLNKhum**Bsu361*** 5'-TTCTCT**CCTTAGG**TGTCCACTCCCAGTCCGTGCT
GACTCAGCCACCTCAACG-3'

3'-NKVLMegaDelBsu 5'-CGGTCAGGGACCCCTGATGGCCGATTA
CTATTACC-3'

3'-A240 overlap 5'-GCCTTGGGCTGACCTAGGACGGTCAACT
TGGTCC-3'

5'-Clam overlap 5'-GTTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTG
CCCCCTCG-3'

5'-A240 **Bsu361** 5'-TTCTCT**CCTTAGG**TGTCCACTCCCAGGCCGTG
CTGACTCAGCCGGC-3'

3'-Clam **NotI** 5'-GACGTAG**CGGCCG**CGTCGACCTATGAACA
TTCTGTAGGGGC-3'

Primer für die Klonierung unterschiedlicher NKG2D Spezies:Klonierung in pGEM-T Easy Vektor:

Mouse NKG2D_for 5'-TCACATAATGGCATTGATTCGTGATCGAAAG-3'

Mouse NKG2D_rev 5'-GTTTTTACACCGCCCTTTTCATGCAGATG-3'

Cyno NKG2D_for 5'-ATTATTTGATGGGGTGGATTCGTGGTCGG-3'

Cyno NKG2D_rev 5'-GATCATCTTTACACAGTCCTCTGCATGCAGATG-3'

Klonierung in pEF-DHFR-Vektor (Schnittstellen: 5'EcoRI und 3'SmaI: His-Tag):

Mouse NKG2D_**EcoRI**_for 5'-**GAATTC**TCACATAATGGCATTGATTCGTG-3'

Mouse NKG2D_**SmaI**_rev 5'-**CCCGGG**GACACCGCCCTTTTCATGCAG-3'

Cyno NKG2D_**EcoRI**_for 5'-**GAATTC**ATTATTTGATGGGGTGGATTCGTGG-3'

Cyno NKG2D_**SmaI**_rev 5'-**CCCGGG**GACACAGTCCTCTGCATGCAGATG-3'

Die Forward- und Reverse-Primer von Cyno (*Macaca fascicularis*) wurden auch für die Amplifikation des jeweiligen NKG2D der Spezies Rhesus (*Macaca mulatta*) und Marmoset (*Callithrix jacchus*) verwendet.

Primer für die Klonierung unterschiedlicher DAP10 Spezies:

Klonierung in pGEM-T Easy Vektor:

Mouse_DAP10_for	5'-ATGGACCCCCCAGGCTACCTCCTGTTCC-3'
Mouse_DAP10_rev	5'-TCAGCCTCTGCCAGGCATGTTGATGTAGAC-3'
Mamu_DAP10_for	5'-CCACCATGATCCATCCGGGTCACATCC-3'
Mamu_DAP10_rev	5'-GGTCAGCCCCTGCCCGGCATGTTG-3'
Cyno_DAP10_for	5'-CCACCATGATCCATCCGGGTCACATCC-3'
Cyno_DAP10_rev	5'-GGGTCAGCCCCTGCCCGGCATG-3'

Die Mamu (*Macaca mulatta* bzw. Rhesus) Forward- und Reverse-Primer wurden auch zur Amplifikation des DAP10 der Spezies Marmoset (*Callithrix jacchus*) verwendet.

Klonierung in pEF-ADA Vektor mit FLAG-Tag:

Cyno_DAP10_XbaI_for	5'-GCTCTAGACAGACGACCCCAGGCTCCTGTTCC-3'
Cyno_DAP10_Sall_rev	5'-ACGCGTCTGACTCAGCCCCTGCCCGGC-3'
Marm_DAP10_XbaI_for	5'-GCTCTAGACAAACGACCCCAGGCTCCTGTTCC-3'
Marm_DAP10_Sall_rev	5'-ACGCGTCTGACTCAGCCCCTGCCCGGC-3'
Mouse_DAP10_XbaI_for	5'-GCTCTAGACAGACATCGGCAGGTTCTGCTCC-3'
Mouse_DAP10_Sall_rev	5'-ACGCGTCTGACTCAGCCTCTGCCAGGCATG-3'

Die Forward- und Reverse-Primer für Cyno und Rhesus sind identisch, und der Reverse-Primer von Cyno ist identisch mit dem Reverse-Primer von Marmoset.

Spezies: Mouse (*Mus musculus*), Marmoset (*Callithrix jacchus*), Cyno (*Macaca fascicularis*) und Rhesus (*Macaca mulatta*)

2.7.4 Vektoren

Vektor	Charakteristik	Herkunft
pEF-DHFR	Derivat des Expressionsvektors pMT2PC, besitzt eine bicistronische Transkriptionseinheit, bestehend aus dem Promotor für den Elongationsfaktor 1 α (EF), einer multiplen Klonierungsregion (MCS), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), dem murinen Dihydrofolatreduktasegen (DHFR), einer Poly-Adenylierungsstelle der SV40 mRNA, bakterieller Ursprung der Replikation (ori), <i>Carb^r</i> (<i>bla</i> -Gen) (Abb. 8)	Invitrogen/ Micromet AG
pEF-ADA	Besitzt statt dem DHFR-Gen ein murines Adenosindeaminase-Gen (ADA) (Abb. 8)	Invitrogen/ Micromet AG
pComb5BHis/N2	Phagemidvektor für das Phagen-Display, Phagenhüllprotein N2 Δ pIII, <i>Carb^r</i> (<i>bla</i> -Gen)	Micromet AG
pComb5BF/H/deIN2	Expressionsvektor für das scFv-Screening, c-terminale FLAG- und Hexahistidinsequenz, <i>Carb^r</i>	Micromet AG
pGEM-T Easy	T7 RNA Polymerase Transkriptions-Initiations-Stelle, multiple Klonierungsregion (MCS), SP6 RNA Polymerase Promoter, SP6 RNA Polymerase Transkriptions-Initiations-Stelle, pUC/M13 Reverse- und Forward-Sequenzierungsprimer-Bindungsstelle, <i>lacZ</i> Startcodon, <i>lac</i> Operator, T7 RNA Polymerase Promotor, β -Lactamase kodierende Region, f1 Phagen Region, <i>lac</i> Operon Sequenz, <i>Amp^r</i>	Promega

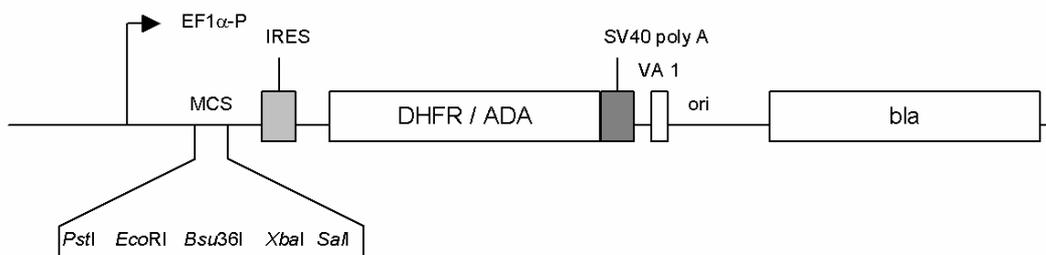


Abbildung 8: Aufbau der Expressions-Vektoren pEF-DHFR und pEF-ADA

2.8 Immunologische Reagenzien

2.8.1 Antikörper

Antigen	Wirt	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung (FACS)
Human IgG1 Isotyp mAk		IgG1			Micromet AG	5 µg/ml
Human IgG1 Isotyp mAk		IgG1λ			Sigma	5 µg/ml
Human IgG1 Isotyp mAk		IgG1λ	Alexa Fluor 488		Micromet AG	5 µg/ml
Maus IgG1 Isotyp mAk	Maus	IgG1κ		MOPC-21	Becton Dickinson	5 µg/ml
Maus IgG2a Isotyp mAk	Maus	IgG2aκ		G155-178	Becton Dickinson	5 µg/ml
Maus IgG2b Isotyp mAk	Maus	IgG2bκ		27-35	Becton Dickinson	5 µg/ml
Ratte IgG2b Isotyp mAk	Ratte	IgG2bκ		141945	R&D Systems	5 µg/ml
Maus IgG1 Isotyp mAk	Maus	IgG1κ	R-PE	MOPC-21	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Maus IgG1 Isotyp mAk	Maus	IgG1κ	PE-Cy5	MOPC-21	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Maus IgG2a Isotyp mAk	Maus	IgG2aκ	R-PE	G155-178	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-Penta His	Maus	IgG1			Qiagen	5 µg/ml
Anti-Penta His	Maus	IgG1	Biotin		Qiagen	1:2000 (WB)
Anti-Penta His	Maus	IgG1	HRP	BMG-His-1	Roche	1:500 (ELISA)
Anti-FLAG	Maus	IgG1		M2	Sigma	1:900
Anti-human CD3	Maus	IgG2a	R-PE	HIT3a	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human CD16	Maus	IgG1κ	PE-Cy5	3G8	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human CD56	Maus	IgG1κ	R-PE	B159	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human CD14	Maus	IgG2aκ	R-PE	M5E2	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human HLA-DR	Maus	IgG2aκ	R-PE	G46-6	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human NKG2D	Maus	IgG1κ	R-PE	1D11	Becton Dickinson	20 µl/1x10 ⁶ Zellen
Anti-human NKG2D	Maus	IgG1		149810 (MAB139)	R&D Systems	5 µg/ml – 10 µg/ml
Anti-human DAP10	Ziege	Polyklonal		N-17	Santa Cruz	1:100

Antigen	Wirt	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung (FACS)
Anti-human MICA	Maus	IgG1 κ		AMO-1	Immatics	5 μ g/ml
Anti-human ULBP-1	Maus	IgG2a		170818	R&D Systems	5 μ g/ml
Anti-human ULBP-2	Maus	IgG2a		165903	R&D Systems	5 μ g/ml
Anti-human ULBP-3	Maus	IgG2a		166510	R&D Systems	5 μ g/ml
Anti-Maus CD16/CD32	Ratte	IgG2b κ		2.4G2	Becton Dickinson	1:100
Anti-human Granzym B	Maus	IgG1		GB11	Serotec	1:100
Anti-human Peforin	Maus	IgG2b		δ G9	Becton Dickinson	1:100
Anti-human CRTAM	Maus	IgG2b		210213	R&D Systems	1,25 μ g/ml
Anti-Maus IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	PE		Jackson/Dianova	1:100
Anti-Maus IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	FITC		Jackson/Dianova	1:100
Anti-human IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	PE		Jackson/Dianova	1:100
Anti-human IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	FITC		Jackson/Dianova	1:100
Anti-Ratte IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	FITC		Jackson/Dianova	1:100
Anti-Ziege IgG (H+L)	Kaninchen		FITC		Jackson/Dianova	1:100
Anti-Maus IgG	Ziege		AP		Sigma	1:500 (WB)
Anti-human IgG	Ziege		HRP		Jackson/Dianova	1:1000 (ELISA)
Anti-human NKG2D	Maus	IgG1		6H7	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D	Maus	IgG1		11B2D10	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D	Maus	IgG2b		8G7E10	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D	Maus	IgG2b		6E5A7	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		E1VL V71KVH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		E4VL G10VH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		B1VL B6VH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		C7VL C3VH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		C7VL C12VH	Micromet AG	5 μ g/ml

Antigen	Wirt	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung (FACS)
Anti-human NKG2D		IgG1 λ		B1VL H5VH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ	Alexa Fluor 488	E4VL G10VH	Micromet AG	5 μ g/ml
Anti-human NKG2D		IgG1 λ	Alexa Fluor 488	B1VL B6VH	Micromet AG	5 μ g/ml

2.8.2 Rekombinante Proteine

Human IgG Fc Fragment	Calbiochem
rek. humanes IL-2 R α (CD25)Fc-Fusionsprotein	R&D Systems
rek. humanes MICA Fc-Fusionsprotein	R&D Systems
rek. humanes NKG2DFc-Fusionsprotein	R&D Systems
rek. humanes ULBP-1Fc-Fusionsprotein	R&D Systems
rek. humanes ULBP-2Fc-Fusionsprotein	R&D Systems
lösliches (sol) humanes His ₆ NKG2D	Micromet AG
lösliches (sol) humanes His ₆ NKG2D-PEGbio	Micromet AG

2.9 Chemikalien und sonstige Reagenzien

ABTS-Substratlösung	Roche
Agarose GTQ	Roth
Alexa Fluor 488-NHS	Molecular Probes, Invitrogen
Arabinose	Sigma
BCIP/NBT	Sigma
BSA	Sigma
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Agar	Difco
Coomassie Färbelösung (SimplyBlue)	Invitrogen
DAPI	Merck
Ethidiumbromid-Lösung 0,07%	AppliChem
Ficoll	Biochrom
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Glucoselösung 40%	Serag Wiessner
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm
IPTG	Roth

Lysozym	Sigma
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth
NuPAGE Antioxidans	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Proben-Reduktions-Agens (10x)	Invitrogen
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Invitrogen
OPD-Substratlösung	Sigma
Radioaktives ⁵¹ Cr	Hartmann Analytics
SOC-Medium	Fluka
Streptavidin-AP	Dako
Tween 20	Roth

2.10 Computersoftware und Datenbanken

BiaEvaluation	Biacore
CBA Instrument Setup Template	Becton Dickinson
CBA Software	Becton Dickinson
CellQuest	Becton Dickinson
Confocal Software	Leica
GeneSnap 6.08	Syngene
Grafiksoftware Amira 3.1.1	Visage Imaging
Grafiksoftware LuciaG Version 4.60	Laboratory Imaging
HyperCLDB Version 4.200201	http://www.biotech.ist.unige.it/cldb
NCBI BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi
NCBI OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM
Primer3-web 0.3.0	http://primer3.sourceforge.net/
Prism 4	GraphPad Software
Reverse and/or complement DNA sequences	http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html
SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
Vector NTI	Infor Max

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolation aus stimulierten humanen NK-Zellen oder PBMCs

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus humanen stimulierten NK-Zellen oder unstimulierten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) verschiedener Spezies (*M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus*) wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Hierzu wurde ausschließlich mit sterilen, RNase-freien Plastikgefäßen und mit Aerosolfiltern gestopften Pipettenspitzen gearbeitet, um einer eventuellen Beschädigung der RNA durch RNasen vorzubeugen.

Zunächst wurden die humanen NK-Zellen nach den Stimulationsversuchen bzw. unstimulierte PBMCs zweimal mit 1x PBS/2% h.i. FCS gewaschen und anschließend lysiert. Dazu wurden bis zu 1×10^7 Zellen in einer der Zellzahl entsprechenden Menge an RLT-Lyse-Puffer (Qiagen, substituiert mit 1% β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Zur Homogenisierung des Zellysats wurde dieses auf eine QIAshredder-Säule pipettiert, die in einem 2 ml Auffanggefäß plaziert war, und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde ebenso wie alle nachfolgenden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Der Durchfluss wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde nun auf eine RNA-Mini Spin-Säule pipettiert und für 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugiert. Um einen höheren Reinheitsgrad der RNA zu erhalten, wurde die restliche DNA aus den Proben mittels RNase-freiem DNase-Set (Qiagen) entfernt. Dazu wurde die Säulenmatrix zunächst mit 350 μ l RW1-Puffer (Qiagen) gewaschen und anschließend für 15 min bei RT mit 80 μ l DNaseI (Qiagen) in RDD-Puffer (Qiagen) inkubiert. Nach Verdau der DNA wurde die Säulenmatrix mit 350 μ l RW1-Puffer (Qiagen) und anschließend mit 500 μ l RPE-Puffer (Qiagen) gewaschen, gefolgt von einem zusätzlichen Waschschrift mit 500 μ l RPE für 2 min. Um jegliche Ethanolreste zu entfernen, welche die nachfolgende Elution der RNA stören könnten, wurde die Säule nochmals für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 30 μ l RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) eluiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde dieser Elutionsschritt nochmals wiederholt. Die RNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch über die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Hierzu wurden die RNA-Proben zuvor für die Messung 1:50 in RNase-freiem 1x PBS (Biochrom) verdünnt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht hierbei 40 μ g RNA pro ml.

Für die folgenden Versuche (Microarray, semiquantitative RT-PCR, Klonierungen) wurde nur aufgereinigte RNA mit einem OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,9-2,1 verwendet. Die RNA wurde entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -70°C gelagert.

3.1.2 Analyse der Genexpression mittels Microarray

DNA-Microarrays dienen dazu, die Transkript-Menge bestimmter Gene zu quantifizieren. Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von DNA-Microarrays: Solche, die auf gebundener cDNA und andere, die auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden basieren. Diese dienen als Sonden (Probe sets), die an definierten Positionen eines Rasters z.B. auf Glasträger (Array-Chip) aufgebracht werden. Unabhängig von der Art der verwendeten Arrays wird RNA zunächst aus dem zu untersuchenden Objekt extrahiert und diese nach eventuellen Aufreinigungs- und/oder Vermehrungsschritten der mRNA in cDNA oder cRNA umgeschrieben und beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese werden dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden markierte cDNA/cRNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array-Chip. Nach Abwaschen der nicht gebundenen cDNA/cRNA Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mit Hilfe eines Lasers abgelesen. Die so gemessene Fluoreszenzintensität wird zusätzlich normalisiert, um Abbaueffekte, die variierende Qualität der Extraktionen und andere Effekte mit zu berücksichtigen.

Die Gesamt-RNA aus unterschiedlich stimulierten humanen NK-Zellen von vier Spendern wurde zur Analyse der Genexpression mittels Microarray an die Affymetrix core facility am Institut für medizinische Mikrobiologie der TU München (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Lang) abgegeben. Hier wurde die Expression der Gene aus den einzelnen Proben mit Hilfe des GeneChip Array Human Genome (HG) 133 Plus 2.0 (> 50000 Probe sets) (Affymetrix) untersucht. Zur statistischen Auswertung wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt, um die zum Teil deutlich unterschiedlichen Grundlevel der einzelnen Spender zu normalisieren. In diesem Test wurde jeweils gepaart der Unterschied zwischen unstimulierten (CD25Fc) und stimulierten (ULBP-1Fc) humanen NK-Zellen verglichen. Die Statistik aus insgesamt 4 Replikaten und 8 Arrays wurde unter Verwendung des SAM (Significance Analysis of Micorarrays)-Algorithmus durchgeführt. Dieser Algorithmus korrigiert für multiples Testen durch Permutation der Class Labels. Die Q-Werte (in Prozent) entsprechen daher in etwa den normalen p-Werten eines t-Tests (1% Q-Wert entspricht 0.01 p-Wert).

3.1.3 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA wurde mittels Omniscript® Reverse Transkriptase (Qiagen) durchgeführt. Für die Reverse Transkription von 4 µg RNA wurde zunächst folgendes Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes: 40 µl) hergestellt und auf Eis gelagert:

- 4 µl 10x RT-Puffer (Qiagen)
- 4 µl Oligo(dT)₁₅-Primer (10 µM) (Roche)
- 4 µl dNTP Mix (5 mM je dNTP) (Qiagen)
- 2 µl RNase-Inhibitor (zuvor auf 10 units/µl mit 1x RT-Puffer verdünnt) (40 units/µl, Roche)
- 2 µl Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen)
- ad 40 µl RNase-freies Wasser

Anschließend wurde 4 µg RNA-Lösung zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, kurz gevortext und abzentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung für Klonierungen oder semiquantitative PCR bei -20°C gelagert.

3.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Nukleinsäuren wurden nach ihrem Molekulargewicht durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 1-2% verwendet. Als Puffersystem wurde meist 1x TAE-Puffer eingesetzt. Für die Auftrennung von Fragmenten zur Klonierung von Phagen-Display-Bibliotheken wurde jedoch autoklavierter 1x Tris-Borat-Puffer (TBE) verwendet. Laufpuffer und Gelpuffer waren stets identisch. Nach Aufkochen der Agarose in Puffer wurden die Gele mit 50 µl einer 0,07%igen Ethidiumbromidlösung (0,7 mg/ml, AppliChem) auf 50 ml Gelvolumen versetzt und horizontal in eine im Gelgießstand (Bio-Rad) eingespannte Gelkammer (Invitrogen) gegossen. Nach Verfestigung der Agarose wurden die Gele in mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammern überführt. Die zu trennende DNA wurde mit DNA-Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 2%igen Agarosegelen für 35 min bei 100V, bei 1%igen Agarosegelen mit 120-170V bei konstanter Voltzahl. Als DNA-Größenstandard wurde der DNA-Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Mit Hilfe des DNA-Interkalators Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Resultat der Auftrennung wurde mit einem Geldokumentationsgerät (Syngene) festgehalten.

3.1.5 Aufreinigung von DNA

3.1.5.1 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraktionskit (Qiagen) verwendet. Damit ließen sich Fragmente in der Größenordnung von 70-10000 bp aufreinigen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Je nach Gewicht des Gelstücks (100 mg ~ 100 µl) wurden 3 Volumen QG-Puffer (Qiagen) zugegeben. Dann wurde die Agarose unter Schütteln im Thermomixer bei 50°C so lange inkubiert, bis sie vollständig gelöst war. Bei der Aufreinigung von Fragmenten < 500 bp und > 4 kb wurde die geschmolzene Agarose zur Erhöhung der Ausbeute mit einem Gel-Volumen Isopropanol (Merck) versetzt. Das Gemisch wurde auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen, die in einem 2 ml Sammelgefäß plaziert war. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min bei RT wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Um die restliche Agarose zu entfernen, wurde die Säule zunächst mit 500 µl Puffer QG- und anschließend mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen (13000 rpm, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde sichergestellt, dass eventuelle Ethanolreste aus Puffer PE von der Säulenmatrix entfernt wurden. Zur Elution der DNA wurden 30-50 µl H₂O auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubation bei 13000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert.

3.1.5.2 Isolation von DNA aus PCR-, Restriktions- oder Ligations-Ansätzen

Die Aufreinigung von DNA aus PCR-, Restriktions- oder Ligationsansätzen wurde mittels QIAquick PCR-Aufreinigungs kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde das Reaktionsgemisch von PCR, Restriktion bzw. Ligation mit einem fünffachen Volumen an PB-Bindungspuffer (Qiagen) vermischt und auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min bei RT wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE (Qiagen) gewaschen (13000 rpm, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde restliches Ethanol aus dem PE-Puffer von der Säulenmatrix entfernt. Zur Elution der DNA wurden 30-50 µl H₂O auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubation bei 13000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert.

3.1.6 Bakterienkultur

Bakterienkulturen wurden entweder aus bereits bestehenden Flüssigkulturen oder durch Picken einzelner Bakterienkolonien von Agarplatten angelegt und über Nacht in Kulturmedium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

3.1.7 Plasmidgewinnung aus *E. coli*

Nach der Transformation von Bakterien mit einem Vektor kann das eingebrachte Plasmid durch das Wachstum der Bakterien vermehrt und für präparative Zwecke zurückgewonnen werden. Dazu wurden die jeweiligen Klone in unterschiedlichen Mengen LB-Medium angeimpft, 50 µg/ml Carbenicillin (Roth) hinzugefügt und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation für 5 bis 15 min bei 6000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet weiter verwendet. Für die Art der verwendeten Plasmidisolationen waren zum einen die benötigte Reinheit der DNA und zum anderen die Ausbeute an Plasmid-DNA ausschlaggebend.

3.1.7.1 Mini-Plasmidpräparation

Zur Präparation kleinster Plasmidmengen aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Die jeweiligen Klone wurden dafür in 2 ml LB-Selektionsmedium (50 µg/ml Carbenicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C am nächsten Tag geerntet und das Bakterienpellet in 250 µl P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Lysepuffer P2 (Qiagen) wurden die Reaktionsgefäße vorsichtig durch Invertieren gemischt und dabei die Bakterien alkalisch lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 350 µl Neutralisationpuffer P3 (Qiagen) und erneutes Invertieren beendet. Das Gemisch wurde anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA von den zellulären Bestandteilen der lysierten Bakterien zu trennen. Nach Überführung des Überstandes in die QIAprep Spin Säule wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm an die Säulenmembran gebunden. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule mit 500 µl PB-Puffer (Qiagen) und anschließend mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von Ethanolresten wurden die Säulen nochmals für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50 µl steriles Wasser (Ultra pure Water, Biochrom) auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubationszeit für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

3.1.7.2 Midi-Plasmidpräparation

Die Isolation mittlerer Plasmidmengen aus *E. coli* erfolgte durch Verwendung des QIAfilter Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen. Für die Präparation der DNA wurde hierzu 50 ml LB-Selektionsmedium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer Starterkultur (1:500 bis 1:1000 verdünnt) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Abzentrifugieren (15 min, 6000 rpm, 4°C) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Zur Lyse wurden die Ansätze mit 4 ml P2-Puffer (Qiagen) versetzt. Es wurde durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml P3-Puffer (Qiagen) zugegeben und wiederum durch Invertieren gemischt, wodurch Proteine, Zellreste und genomische DNA gefällt wurden. Die Lysate wurden nun in Filterspritzen (Qiagen) überführt und 10 min bei RT inkubiert. Durch langsames Einführen des Stempels in die Filterspritze wurde das Lysat gleichzeitig filtriert und auf eine zuvor mit 4 ml QBT-Puffer (Qiagen) equilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule überführt. Nach dem Durchlauf des Ansatzes durch die Säule wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 5 ml QF-Puffer (Qiagen) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (5000 x rpm, 4°C, 60 min). Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen (5000 x rpm, 4°C, 60 min), getrocknet, in 50 µl ultra pure H₂O (Biochrom) resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung zuvor 1:70 in ultra pure H₂O verdünnt.

3.1.7.3 Maxi-Plasmidpräparation

Zur Präparation größerer Plasmidmengen aus *E. coli* für Transfektionen von eukaryotischen Zellen wurde die DNA über das Endofree Plasmid Maxi-Kit (Qiagen) isoliert, um eine endotoxinfreie Aufreinigung zu gewährleisten. Dazu wurden 250 ml LB-Selektionsmedium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer Vorkultur (1:500 bis 1:1000 verdünnt) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation in einem Sorvall GS3 Rotor (15 min, 6000 rpm, 4°C) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Zur Lyse wurden die Ansätze mit 10 ml P2-Puffer (Qiagen) versetzt. Es wurde durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml P3-Puffer (Qiagen) zugegeben und wiederum durch Invertieren gemischt, um Proteine und Zellbruchstücke auszufällen. Die Lysate wurden nun in Filterspritzen (Qiagen) überführt und 10 min bei RT inkubiert. Durch langsames Einführen des Stempels in die Filterspritze wurde das Lysat gleichzeitig filtriert und auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer (Qiagen)

equilibrierte QIAGEN-tip 500 Säule überführt. Nach dem Durchlaufen des Ansatzes durch die Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 15 ml QF-Puffer (Qiagen) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (5000 x rpm, 4°C, 60 min). Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen (5000 x rpm, 4°C, 60 min), getrocknet, in 500 µl ultra pure H₂O (Biochrom) resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung zuvor 1:70 in ultra pure H₂O verdünnt.

3.1.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.1.8.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung wurde die Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 37 µg/ml ssDNA und 40 µg/ml RNA. Der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren in Bezug auf Proteine ließ sich durch den Quotienten aus der OD bei 260 nm und 280 nm bestimmen. Reine Nukleinsäuren liegen bei einem Wert von 1,7 bis 1,9 vor.

3.1.8.2 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Massenstandards im Agarosegel

Durch den Vergleich mit einem Massenstandard im Agarosegel ist die Bestimmung von sehr geringen DNA-Konzentrationen (bis zu 5 ng/µl) möglich. Dazu wurde ein definiertes Volumen der DNA-Lösung und des Markers Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und miteinander verglichen. Bei einem Auftrag von 2 µl entsprachen die DNA-Banden dieses Markers einer Masse von 5, 10, 20, 40, 60 und 100 ng/µl. Diese Methode wurde vor allem für Konzentrationsbestimmungen im Rahmen der Klonierung von scFv-Bibliotheken eingesetzt.

3.1.9 Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA-Abschnitten im Auftrag der Firma Micromet AG wurden stets von der Firma Sequiserve (Vaterstetten; www.sequiserve.de) mit einem ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät durchgeführt. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit der Vector NTI Software auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*. Dabei wird ein begrenztes Stück einer DNA-Matrize (Template) durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe zweier Oligonukleotide (Primer) und einer DNA-Polymerase amplifiziert. Ein Zyklus besteht typischerweise aus der Denaturierung der DNA-Matrize bei 95°C, der Anlagerung („Annealing“) der Primer bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur und der Kettenverlängerung beim Temperaturoptimum der jeweiligen DNA-Polymerase (meist 72°C).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Polymerasen verwendet: Taq-, Pfu-, und High Fidelity-DNA-Polymerase. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase besitzen High Fidelity- und Pfu-Polymerase die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur und haben somit eine niedrigere Fehlerquote beim Einbau von Nukleotiden. Die Reaktionspuffer wurden mit den jeweiligen Enzymen mitgeliefert, und Desoxynukleotide wurden der PCR-Reaktion in einer Endkonzentration von je 40-100 µM zugesetzt. Bei der Primerauswahl wurde auf eine annähernd gleiche „Annealing“-Temperatur von Forward- und Reverse-Primer geachtet. Die PCR-Primer können am 5'-Ende der zum Template komplementären Sequenz eine nicht-komplementäre Sequenz enthalten. Diese fügt dem Amplifikat z. B. eine Schnittstelle zur weiteren Klonierung oder eine bestimmte Aminosäuresequenz hinzu. Die Primerkonzentration der PCR-Reaktionen lag bei 0,2 - 0,4 µM.

3.2.1 Amplifikations- und Fusions-PCR

Die Amplifikations-PCR wurde dazu verwendet, um über Primer eine bestimmte DNA-Sequenz aus einer cDNA zu gewinnen oder auch neue Schnittstellen und Aminosäuresequenzen an die gewünschte DNA anzubauen. Insbesondere bei der Herstellung der unterschiedlichen NKG2D- und DAP10-Spezies und der Generierung ganzer humaner IgG Antikörper wurden neue Sequenzen eingefügt (s. 3.3.5 und 3.3.6).

PCR-Ansatz:

- x µl DNA-Template (ca. 20 ng)
- 5 µl 10x High-Fidelity-Puffer (Roche)
- 2 µl Forward-Primer (10 µM)
- 2 µl Reverse-Primer (10 µM)
- 1 µl dNTP (2 mM) (Fermentas)
- 1 µl High-Fidelity-DNA-Polymerase (Roche)
- ad 50 µl H₂O

PCR-Zyklen:

1. Denaturierung	4 min	97°C	} 30 x
2. Denaturierung	30 sec.	97°C	
3. Primer-Anlagerung	30 sec.	55-60°C	
4. DNA-Polymerisation	30 sec.	72°C	
5. DNA-Polymerisation	7 min	72°C	

Um aus den einzelnen variablen Domänen der VL und der VH einen ganzen Antikörper (IgG1 λ) herzustellen, wurde die klonierte DNA der VL-Domäne durch eine PCR mit dem konstanten C λ -Teil fusioniert (s. 3.3.6).

PCR-Ansatz:

2,5 μ l	C λ PCR-Amplifikat
2,5 μ l	VL PCR-Amplifikat
10 μ l	10x Taq-Puffer (Roche)
1 μ l	5'-A240 Bsu36I (20 μ M)
1 μ l	3'-Clam NotI (20 μ M)
0,8 μ l	dNTP (2 mM) (Fermentas)
1 μ l	Taq-DNA-Polymerase (Roche)
58,7 μ l	H ₂ O

PCR-Zyklen:

1. Denaturierung	3 min	94°C	} 35 x
2. Denaturierung	2 min	97°C	
3. Primer-Anlagerung	2 min	52°C	
4. DNA-Polymerisation	2 min	72°C	
5. Denaturierung	1 min	94°C	
6. Primer-Anlagerung	1 min	52°C	
7. DNA-Polymerisation	1,5 min	72°C	
8. DNA-Polymerisation	10 min	72°C	

3.2.2 Kolonie-Screening-PCR

Diese Art der PCR wurde zur Überprüfung der vorgenommenen Subklonierungen angewendet. Hierzu wurden zunächst 5 Klone je Transformation gepickt und in 50 μ l LB-Selektionsmedium (50 μ g/ml Carbenicillin) für 1 h bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Von diesen ausgewählten Klonen wurden letztendlich je 1 μ l pro PCR eingesetzt. Als Primer wurden ein 5'- und ein 3'-Vektorprimer (s. 2.7.3, S. 43) verwendet, zwischen denen die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors liegt. In der ersten Denaturierungsphase des PCR-Programms wird nicht nur die Nukleinsäure denaturiert,

sondern auch die Bakterienhülle zerstört und somit die Nukleinsäuren für die PCR zugänglich gemacht. Im weiteren Verlauf der PCR wird das DNA-Fragment zwischen den Primern amplifiziert. Im Falle einer erfolgreichen Subklonierung konnte im Agarose-Gel eine Bande der erwarteten Größe beobachtet werden, wobei sich zur Größe der Ziel-DNA noch die Größe der Vektorstücke bis zu den beiden verwendeten Primern addierten. Diese Art der Überprüfung sagt jedoch nichts über die Orientierung der klonierten DNA-Fragmente im Vektor aus.

3.2.3 Semiquantitative RT-PCR

Um die Ergebnisse aus dem Microarray (s. 3.1.2) zu bestätigen, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Diese Methodik dient der Quantifizierung spezifischer RNA-Transkripte und der Detektion von Abweichungen in ihrer Expressionsstärke bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Zur Expressionsanalyse verschiedener RNA-Transkripte (humanes IL-3, humanes IFN γ , humanes LIF, humanes XCL-1, humanes β -Aktin) wurde zunächst die RNA aus unterschiedlich stimulierten humanen NK-Zellen isoliert (s. 3.1.1 und 3.10.5) und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (s. 3.1.3). In den semiquantitativen PCR-Analysen wurden je PCR-Ansatz 0,5 μ l der cDNA eingesetzt und diese durch Verwendung spezifischer Primer amplifiziert (s. 2.7.3, S. 43). Die Primer wurden mit Hilfe der Primer3-web 0.3.0 Software (<http://primer3.sourceforge.net/>) entworfen und von der Firma Metabion synthetisch generiert. Beim Primer-Design wurden folgende Aspekte berücksichtigt, um eine hohe PCR-Effizienz und eine Generierung spezifischer PCR-Produkte zu erhalten:

- Primer-Länge: 18-30 Basen
- GC-Gehalt: 40-60%
- T_m 63-67°C (Δ T_m zwischen Forward- und Reverse-Primer \leq 4°C), mit einer optimalen Annealing Temperatur von 58-62°C
- Vermeidung von 3'-T Enden
- Vermeidung einer Reihung von 3 Gs oder Cs am 3'-Ende
- Vermeidung komplementärer Bereiche innerhalb der Primer (Hairpin-Strukturen)

Die so generierten Primer wurden anschließend mit Hilfe eines Oligo-Blast Programmes (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST/cgi) auf ihre Spezifität hin untersucht.

Nach unterschiedlich vielen PCR-Zyklen (24-36) wurden die Proben der Negativkontrolle (stimuliert mit CD25Fc) und der zu analysierenden Liganden-Stimulation (ULBP-1Fc) auf ein DNA-Gel aufgetragen. Aus dem Produkt der Bandenfläche und dem Mittelwert der Bandenhelligkeit wurde die Bandenintensität des Ziel- und des Kontrollgens berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis des Zielgens (T, d.h. IFN γ , IL-3: n = 8; LIF,

XCL-1: n = 6) zum Kontrollgen (C, d.h. β -Aktin) für die Proben der CD25Fc- und ULBP-1Fc-Stimulation von unterschiedlichen Spendern ermittelt. Dieses T/C-Verhältnis gibt die relative Amplifikation des Zielgens (T) im Verhältnis zur internen Housekeeping Gen-Kontrolle β -Aktin (C) an. Die Auswertung erfolgte mit der Software Lucia G Version 4.60. Die statistische Auswertung erfolgte über die Software GraphPad Prism. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Wilcoxon Matched Pairs Test durchgeführt.

PCR-Ansatz:

- 0,5 μ l cDNA
- 2 μ l 10x High-Fidelity PCR-Puffer (Roche)
- 1 μ l Forward-Primer (10 μ M)
- 1 μ l Reverse-Primer (10 μ M)
- 2 μ l dNTP (2 mM) (Fermentas)
- 0,5 μ l High-Fidelity DNA-Polymerase (Roche)
- ad 20 μ l H₂O

PCR-Zyklen:

1. Denaturierung	3 min	95°C	} 24 + 3 + 3 + 3 + 3 Zyklen
2. Denaturierung	30 sec.	95°C	
3. Primer-Anlagerung	30 sec.	60°C	
4. DNA-Polymerisation	30 sec.	72°C	
5. DNA-Polymerisation	5 min	72°C	

3.2.4 Einführung von Punktmutationen über PCR

Um Punktmutationen in ein Gen einzuführen, wurde das QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Hersteller-Protokoll. Der Kit basiert auf der Tatsache, daß die parentale Plasmid-DNA *in vivo* durch Bakterien im Sequenzabschnitt 5'-GATC-3' durch Methylierung zu 5'-G^{M6}ATC-3' modifiziert wird. *In vitro* neusynthetisierte und mutierte Plasmide hingegen besitzen diese Modifikation nicht. Bei 5'-G^{M6}ATC-3' handelt es sich um die Erkennungssequenz der Endonuklease DpnI, deren Aktivität dazu verwendet wird, die parentale DNA zu verdauen und damit aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Zur Mutagenese wurden zwei zueinander komplementäre Primer (sense und antisense) verwendet (s. 2.7.3, S. 43f), welche die gewünschte Mutation in der ursprünglichen Nukleotidsequenz enthielten. Ähnlich einer PCR wurden die Mutationsprimer an ein hitzedenaturiertes wt-Plasmid angelagert und dienten so als Ausgangspunkt für die Synthese mutierter Plasmide durch die Pfu-Polymerase. Das restliche methylierte parentale wt-Plasmid wurde anschließend mit 10 U der Endonuklease DpnI für 2 h bei 37°C verdaut. Zwei μ l der übriggebliebenen

neusynthetisierten Plasmide, welche nun die gewünschte Mutation enthielten, wurden in NovaBlue-Bakterien transformiert (s. 3.3.7.1).

PCR-Ansatz:

- x µl DNA-Template (20 ng)
- 5 µl 10x Pfu-PCR-Puffer (Fermentas)
- 2 µl Forward-Primer (10 µM)
- 2 µl Reverse-Primer (10 µM)
- 2 µl dNTP (2 mM) (Fermentas)
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas)
- ad 50 µl H₂O

PCR-Zyklen:

1. Denaturierung	30 sec.	95°C	} 18 x
2. Denaturierung	30 sec.	95°C	
3. Primer-Anlagerung	1 min	58°C	
4. DNA-Polymerisation	4 min	68°C	

3.3 Klonierungen

3.3.1 Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Der spezifische Verdau von dsDNA erfolgt durch Verwendung von Restriktionsendonukleasen. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, welche bestimmte DNA-Basensequenzen erkennen und die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in einem Polynukleotid katalysieren.

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. In der Regel reicht eine Enzymeinheit (1 U) aus, um 1 µg DNA in 60 min zu verdauen. Es ist aber üblich, einen zehnfachen Überschuß an Enzym zu verwenden. Daher wurde beim Schneiden von 1 µg DNA jeweils 10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau erfolgte hierbei für 1-2 Stunden jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem, um eine optimale Salzkonzentration und einen optimalen pH-Wert zu garantieren. Das Temperaturoptimum der eingesetzten Enzyme wurde ebenfalls den Herstellerangaben entnommen. Um eine sequenzunabhängige Enzymaktivität (star-Aktivität) zu vermeiden, wurde bei der Menge des eingesetzten Enzyms stets darauf geachtet, dass die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz unter 5% lag. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend im Agarosegel aufgetrennt und für weitere analytische oder präparative Zwecke aus dem Gel extrahiert (s. 3.1.5.1).

3.3.2 Dephosphorylierung von Vektoren mit Alkalischer Phosphatase

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden beide Komponenten zunächst mit geeigneten, kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten (s. 3.3.1) und die entsprechenden Fragmente über Gelextraktion (s. 3.1.5.1) aufgereinigt. Um eine bessere Ligation von DNA-Fragment und Vektor zu erhalten, wurde einer Religation des Vektors durch die Abspaltung der Phosphatgruppen am 5'-Ende (Dephosphorylierung) mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (Calf Intestinal (CIP), New England Biolabs) vorgebeugt. Dazu wurde ca. 1 µg geschnittener Vektor mit 0,5 U Enzym im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem für 60 min bei 37°C inkubiert und die dephosphorylierte DNA anschließend wieder über das PCR Aufreinigungs Kit aus dem Reaktionsansatz isoliert.

3.3.3 Ligation von DNA

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und freien 3'-Hydroxylgruppen an den Enden von geschnittener dsDNA. Es kann dadurch sowohl DNA mit glatten (blunt) als auch mit überhängenden Enden (sticky) verknüpft werden. Bei der Durchführung wurden in der Regel etwa 100 ng dephosphorylierter Vektor und ein bis zu dreifacher molarer Überschuss an DNA-Fragment eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl 10x Ligationspuffer (Roche) und den entsprechenden Volumina an geschnittenem DNA-Fragment und Vektor wurde der Ansatz mit Wasser auf 19 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche) oder 1 µl T4-DNA Quick-Ligase (New England Biolabs) zugegeben. Bei Verwendung der T4-DNA-Ligase (Roche) wurde der Ansatz entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 15°C im Thermocycler, bei Verwendung der T4-DNA Quick-Ligase lediglich für 5 min bei RT inkubiert. Bei der Herstellung von Phagen-Display-Bibliotheken wurden jedoch 1,2 µg Vektor mit 0,4 µg DNA-Fragment zusammen mit 15 µl T4-DNA-Ligase (Roche) und 20 µl 10x Ligationspuffer (Roche) in einem Gesamtvolumen von 200 µl über Nacht bei 15°C ligiert. Je nach Art der verwendeten *E. coli* Bakterien wurde anschließend nur ein Teil des Ligationsansatzes oder der ganze Reaktionsansatz für die Transformation verwendet.

3.3.4 Klonierung in pGEM-T Easy Vektor

Für eine effizientere Ligation von PCR-Produkten mit Vektoren wurden diese zunächst in einen pGEM-T Easy Vektor (Promega) subkloniert. Der mit *EcoRV* geschnittene Vektor besitzt an der multiplen Klonierungsstelle 3'-T Überhänge, die eine Ligation von PCR-

Produkten in den Vektor deutlich verbessern, da bestimmte DNA-Polymerasen während einer PCR 3'-A Überhänge an die Amplifikate knüpfen.

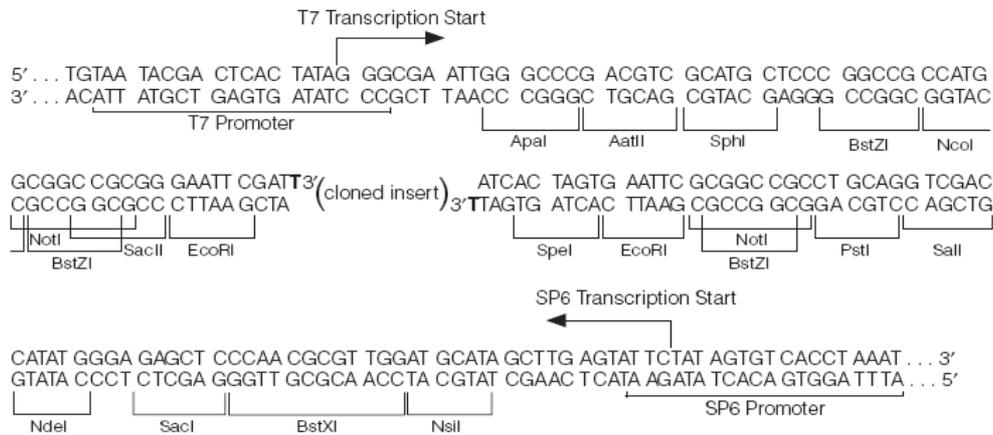


Abbildung 9: Promotor und multiple Klonierungsstelle des pGEM-T Easy Vektors

Zur Ligation von PCR-Produkten mit pGEM-T Easy Vektor wurden folgende Reaktionen angesetzt und anschließend für 1 h bei RT inkubiert:

	Reaktion	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle
2x Ligations-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM-T Easy Vektor	1 µl	1 µl	1 µl
PCR-Produkt	X µl	-	-
Kontroll-Fragment	-	2 µl	-
T4-DNA Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
dest. H ₂ O auf	10 µl	10 µl	10 µl

Die Ligationsansätze wurden schließlich in NovaBlue Zellen transformiert (s. 3.3.7.1).

3.3.5 Klonierung von unterschiedlichen NKG2D- und DAP10-Spezies in die Expressionsvektoren pEF-DHFR und pEF-ADA

Für die Herstellung von Expressionsvektoren zur Produktion von membranständigem NKG2D und DAP10 unterschiedlicher Spezies auf CHO-dhfr-Zellen (s. 3.6.2) wurde zunächst cDNA aus PBMCs gewonnen (s. 3.10.3, 3.1.1 und 3.1.3) und die DNA-Sequenzen von NKG2D und DAP10 über PCR mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert (s. 2.7.3, S.45/46 und 3.2.1). Anschließend wurden die über Gelextraktion (s. 3.1.5.1) aufgereinigten DNA-Fragmente in den pGEM-T Easy Vektor subkloniert (s. 3.3.4) und in NovaBlue-Bakterien zur Herstellung von DNA-Mini-Präparationen (s. 3.3.7.1 und 3.1.7.1) transformiert. Nach Überprüfung der DNA-Sequenzen (s. 3.1.9) wurde über eine weitere PCR an die NKG2D- und DAP10-Sequenzen in den pGEM-T Easy-Vektoren

Restriktionsschnittstellen zur Umklonierung in die entsprechenden Vektoren pEF-DHFR oder pEF-ADA angefügt (s. 2.7.3, S.45/46 und 3.2.1). Die daraus erhaltenen PCR-Produkte wurden über Gelextraktion aufgereinigt und ebenfalls in pGEM-T Easy Vektoren subkloniert (s. 3.3.4). Die unterschiedlichen NKG2D-Spezies wurden anschließend über *EcoRI* und *SmaI* in einen ebenso geschnittenen pEF-DHFR-Vektor mit C-terminalem His-Tag ligiert. Die unterschiedlichen DAP10-Spezies wurden hingegen über *XbaI* und *Sall* in einen ebenso geschnittenen pEF-ADA-Vektor mit N-terminalem FLAG-Tag ligiert. Die fertigen Konstrukte wurden zur Herstellung von DNA-Maxi-Präparationen (s. 3.1.7.3) in NovaBlue-Bakterien transformiert. Die Expressionsvektoren aus der Maxi-Präparation wurden nochmals sequenziert, durch vergleichende Sequenzanalysen mit der Software Vector NTI kontrolliert und schließlich für die Transfektion von CHO-dhfr⁻-Zellen (s.3.6.2) verwendet.

3.3.6 Umklonierung der humanen scFv in ein humanes IgG Antikörperformat

Zur Produktion ganzer humaner IgG1 Antikörper in CHO-dhfr⁻-Zellen (s. 3.6.2) mussten die variablen Domänen VH und VL der humanen scFv in die Expressionsvektoren pEF-DHFR und pEF-ADA kloniert werden. Hierzu wurden den unterschiedlichen humanen VH-Fragmenten in pComb5BF/H/delN2-Vektor mittels PCR am 5'-Ende eine *Bsu36I*-Schnittstelle angehängt (s. 2.7.3, S.45) und die mit *Bsu36I* verdauten PCR-Produkte in einen ebenso verdauten pEF-DHFR-Vektor ligiert. Anschließend wurden über *XbaI*-Verdau die konstanten Domänen CH1, CH2 und CH3 aus einem bereits vorhandenen humanen IgG1-Konstrukt eingefügt.

Die Umklonierung der humanen VL fand in mehreren Schritten statt. Im ersten Schritt wurden die humanen VL-Regionen bei gleichzeitiger Deletion einer internen *Bsu36I*-Schnittstelle amplifiziert. Hierzu wurde zunächst mittels PCR und spezieller Primer (s. 2.7.3, S. 45) auf einem humanen VH-Template ein sogenannter 5'-Megaprimer hergestellt. Mit Hilfe dieses 5'-Megaprimers und einem 3'-A240 overlap Primer wurden die humanen VLs dann aus dem pComb5BF/H/delN2-Vektor amplifiziert. In einer weiteren PCR-Reaktion wurde von einem bereits vorhandenen Konstrukt der humane konstante C λ -Teil gewonnen. Über eine Fusions-PCR (s. 3.2.1) wurden schließlich die variablen VL-Domänen mit dem konstanten C λ -Teil fusioniert, über *Bsu36I* und *NotI* in einen pBS-pol_L-Vektor (Micromet AG) subkloniert und anschließend über *EcoRI* und *Sall* in pEF-ADA-Vektor kloniert. Beide Expressionsvektoren wurden für eine Maxi-Plasmid-Präparation in *E. coli* TG1 transformiert. Die aus der Maxi-Präparation gewonnenen Expressionsvektoren wurden nochmals sequenziert und kontrolliert und schließlich für die Transfektion von CHO-dhfr⁻-Zellen (s.3.6.2) verwendet.

3.3.7 Transformation von *E. coli*

3.3.7.1 Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien

Zur Transformation von TG1 *E. coli*-Zellen (100 µl) wurden diese auf Eis aufgetaut und 10 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Nach 10-15 min auf Eis wurde der Ansatz für genau 5 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert, anschließend 900 µl LB-Medium (RT) zupipettiert und durchmischt. Die Zellen wurden 45-60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und dann jeweils 10% und 90% der Zellsuspension auf Agarplatten mit Selektionsmedium (100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert. Die Zellen, welche das Plasmid mit der entsprechenden Resistenz erworben hatten, bildeten nach einer 16- bis 18-stündigen Inkubation bei 37°C deutlich sichtbare Kolonien.

Bei der Transformation von NovaBlue Bakterien wurden zu 50 µl Zellaliquots 1-2 µl DNA-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt, für 5 min auf Eis und anschließend für genau 30 sec. bei 42°C im Thermoblock inkubiert. Nach einer 2 min Inkubation auf Eis wurde 250 µl SOC-Medium (Novagen) (RT) zugegeben und schließlich 5-50 µl der transformierten Bakterien auf LB-Platten (100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert.

3.3.7.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Diese Art der Transformation wurde ausschließlich für das Phagen-Display durchgeführt. Pro Ansatz wurden hierbei 300 µl elektrokompente *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) vorsichtig auf Eis aufgetaut und zur aufgereinigten DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben. Nach Vermischen wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette (0,2 cm gap, Bio-Rad) überführt, 1 min auf Eis inkubiert und die Elektroporation in einem Bio-Rad GenePulser (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) durchgeführt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 4 ml vorgewärmtes SOC-Medium (Fluka) aufgenommen und unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10 ml SB low-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 20 µg/ml Carbenicillin) zugegeben, für die Bestimmung der Elektroporationseffizienz 11 µl des Gemisches abgenommen und in 100 µl LB-Selektionsmedium (50 µg/ml Carbenicillin) verdünnt. Es wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurde die Koloniezahl bestimmt und die Gesamtzahl der Klone pro Ansatz errechnet (Transformations-Effizienz).

3.4 Phagen-Display

Das Phagen-Display und die damit zusammenhängenden Methoden wurden gemäß dem von der Firma Micromet AG standardisierten Protokoll durchgeführt, wie dies bereits in der Dissertation von Dr. Eva-Maria Krinner beschrieben wurde.

3.4.1 Produktion von VCSM13 Helferphagen

Zur Herstellung von VCSM13-Helferphagen wurde eine Einzelkolonie *E. coli* XL1-Blue in 5 ml SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Das in der Bakterienkultur enthaltene Tetracyclin sollte hierbei den Verlust des in *E. coli* XL1-Blue vorliegenden F'-Plasmids verhindern. Auf dem F'-Plasmid befindet sich die genetische Information für die Proteine des Sex-Pilus, welcher als Andockstation bei der Infektion von *E. coli* durch M13-Phagen von Bedeutung ist. Das F'-Plasmid kodiert außerdem für das Transposon Tn10, durch welches die Tetracyclinresistenz vermittelt wird. Durch den Einsatz von Tetracyclin im Kulturmedium wurde demnach sichergestellt, dass in der Kultur nur für eine Phageninfektion empfängliche Bakterien wuchsen. Ein ml dieser Übernachtskultur wurde in 20 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) überführt und mit einem Phagenplaque angeimpft. Nach 2 h Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln wurde die Kultur in 1 L SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Kanamycin (70 µg/ml) überführt und über Nacht weiter bei 37°C geschüttelt. Da die verwendeten VCSM13-Phagen bei der Infektion die Resistenz gegen Kanamycin auf die Bakterien übertragen, konnten sich in dieser Doppelsektion nur phageninfizierte Bakterien mit F'-Plasmid vermehren. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (2200 rpm, 20 min, 4°C) aus der Kultur entfernt. Der phagenhaltige Überstand wurde zur Inaktivierung von Proteasen für 20 min bei 70°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Dieser Überstand wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 100 µl einer frisch angezogenen *E. coli* XL1-Blue Kultur ($OD_{600} \approx 1$) mit 3 ml Topagar (42°C, 0,6 g Agar in LB-Medium gelöst) vermischt, 10 µl einer Verdünnung des Phagenüberstandes zugegeben, gut gemischt und auf eine LB-Platte gegossen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht bildete sich ein durchgehender Bakterienrasen, auf welchem sich kreisrunde Plaques mit vermindertem Bakterienwachstum zeigten. Jeder Plaque entsprach einem Phagenklon (pfu, plaque forming unit). Es wurde die pfu durch Verdünnungen der Phagensuspension in Zehnerschritten von 10^{-8} bis 10^{-13} bestimmt und die Konzentration in der Ausgangssuspension errechnet.

3.4.2 Herstellung von scFv-Bibliotheken

Anhand der Daten muriner Anti-human NKG2D Antikörper im ^{51}Cr -Freisetzungsexperiment wurden zwei murine Antikörper für die Humanisierung ausgewählt. Zunächst wurde die VH der beiden murinen scFv 6E5A7 und 6H7 in einer PCR mittels Oligonukleotid-Primern (s. 2.7.3, S. 43) amplifiziert. Mit Hilfe der PCR (PCR-Ansatz und -Programm s. 3.5.1, S. 76) wurden die entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die Umklonierung der murinen VHs in den Phagen-Display-Vektor eingefügt. Die PCR-Fragmente wurden über Gelextraktion (s. 3.1.4 und 3.1.5.1) aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *BstEII* verdaut (s. 3.4.2.1 und 3.3.1) und in einen pComb5BHis-Vektor ligiert. Die beiden Expressionsvektoren 6E5A7VHVL_{Stuffer}pComb5BHis und 6H7VHVL_{Stuffer}pComb5BHis wurden in TG1 transformiert (s. 3.3.7.1) und anschließend eine Plasmid-Midi-Präparation durchgeführt (s. 3.1.7.2). Nach Überprüfung der Sequenzen (s. 3.1.9) konnten die beiden Phagen-Display-Bibliotheken bestehend aus einer der murinen VHs (6H7 oder 6E5A7) und einem Pool an humanen Lamda- und Kappa-VLs (hVL λ/κ) generiert werden. Hierzu wurden die Vektoren 6E5A7VHVL_{Stuffer}pComb5BHis, 6H7VHVL_{Stuffer}pComb5BHis und VH_{Stuffer}hVL-pComb5BHis (je ein Vektor für Lamda- und Kappa-VL) mit den Enzymen *SacI* und *SpeI* geschnitten, wodurch je nach Vektor entweder der VL-Stuffer oder der h λ/κ VL-Pool ausgeschnitten wurde. Die verdauten Fragmente wurden über ein 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.1.4) und jeweils die hVL λ/κ oder das murineVH_{Stuffer}pComb5BHis-Vektorgerüst über Gelextraktion aufgereinigt. Schließlich wurden die beiden VH_{Stuffer}pComb5BHis-Vektorgerüste (6E5A7 und 6H7) mit dem hVL λ/κ -Pool ligiert (s. 3.4.3) und für das Phagen-Display in XL1-Blue Bakterienzellen mittels Elektroporation eingebracht (s. 3.3.7.2 und 3.4.2.2).

3.4.2.1 Subklonierung der VH- und VL-Fragmente in den Phagemid-Vektor pComb5BHis

Der Phagemidvektor pComb5BHis (Micromet AG) erlaubt die periplasmatische Expression von scFv-Fragmenten als Translationsfusion mit dem Phagenhüllprotein pIII in *E. coli*. Das bla-Gen vermittelt transformierten Bakterien Resistenz gegenüber Carbenicillin. Für die Klonierung von scFv-Bibliotheken wurden nacheinander die kodierenden Sequenzen für VH oder VL (Einzelgene oder Repertoires) einkloniert. Die für die notwendigen Restriktionsansätze eingesetzte Menge an Restriktionsenzymen wurde wie folgt berechnet:

Definition: 1 U Restriktionsenzym entspricht der Enzymmenge, die 1 µg DNA des Lambda-Phagen in 1 h bei 37°C vollständig schneidet.

Daraus folgt:

Benötigte Enzymmenge [U/µg DNA]

= (bp Lambda x Schnittstellen in DNA-Fragment) / (bp Fragment x Schnittstellen in Lambda)

Für Enzyme, die das Genom des Lambda-Phagen (50000 bp) nicht schneiden, wird die Bestimmung der Units z.B. auf das Genom von Adeno-2 (35937 bp) normiert.

Tabelle 5: Verwendete Enzymmenge pro µg Fragment bzw. Vektor. Für die Berechnung der zu verwendenden Enzymmengen wurde die Anzahl der Schnittstellen in der Lambda- bzw. Adeno-2 (*SpeI*) DNA dem Katalog der Firma New England Biolabs entnommen (aus Dissertation E. Krinner, Micromet AG).

[U] / µg DNA	VH	VL	pComb5BHis	pBluescript
XhoI	143	---	9	17
BstEII	11	---	1	1,3
SacI	---	72	5	8
SpeI	---	35	2	2,1

Angaben in Unit Enzym / µg DNA

Die Restriktionsansätze wurden stets nur mit einem Enzym durchgeführt und das Gesamtreaktionsvolumen auf mindestens ein zehnfaches des eingesetzten Enzymvolumens eingestellt. Neben Enzym und dem zu schneidenden VH- oder VL-Fragment oder der Vektor-DNA enthielt ein Restriktionsansatz den vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde beim Temperaturoptimum für das jeweilige Enzym für mindestens 2 h inkubiert. Darauf folgte eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick PCR-Aufreinigungskit (s. 3.1.5.2). Nur Ansätze, bei denen erwartet wurde, dass zwei Fragmente entstehen, von denen beide größer als 100 bp waren, wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraktionskit (s. 3.1.5.1) aufgereinigt. Die DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. In Ligationsansätzen zur Klonierung von Selektionsbibliotheken wurden stets 1200 µg geschnittener Vektor und 400 µg geschnittenes VH- oder VL-Fragment eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt zudem 20 µl 10x Ligationspuffer (Roche) und 15 U T4-DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Nach einer Inkubationszeit von ca. 18 h bei 15°C wurde die DNA aus diesem Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR-Aufreinigungskit (s. 3.1.5.2) aufgereinigt. Der gesamte Ansatz wurde in die nachfolgende Elektroporation eingesetzt.

3.4.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation von *E.coli* XL1-Blue wurde gemäß der Beschreibung im Abschnitt 3.3.7.2 durchgeführt. Der Elektroporationsansatz wurde sofort nach Abnahme des Anteils für die Effizienzbestimmung eine weitere Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Carbenicillinkonzentration auf 50 µg/ml erhöht und nochmals 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10¹² pfu VCSM13-Helferphagen zugegeben, kurz vermischt, das Kulturvolumen mit SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Carbenicillin) auf 100 ml erhöht und erneut 2 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) auf VCSM13-infizierte Bakterien selektiert. Bakterien, welche sich in der folgenden Übernachtinkubation unter Schütteln bei 37°C vermehrten, enthielten also den pComb5BHis-Vektor (vermittelt Carbenicillin-Resistenz) mit der genetischen Information für ein scFv-Fragment, sowie Helferphagen-DNA (vermittelt Kanamycin-Resistenz). Diese Bakterien sezernierten scFv-tragende Phagen ins Medium.

3.4.3 Isolation von Phagen aus Kulturüberstand

Zunächst wurden Bakterien durch Zentrifugation (2200 rpm, 20 min, 4°C) aus dem phagenhaltigen Überstand entfernt. Das Bakterienpellet enthielt in Form des pComb5BHis-Vektors die genetische Information der aktuellen scFv-Bibliothek. Diese genetische Information wurde durch Präparation des Plasmidpools konserviert. Im Kulturüberstand war die aktuelle scFv-Bibliothek phäno- und genotypisch in den Phagen repräsentiert, die scFv auf ihrer Oberfläche trugen. Ein Teil des Kultur-Überstandes (2-50 ml) wurde stets für eventuelle spätere Versuche durch Lagerung bei 4°C gesichert. Im verbleibenden Phagenüberstand wurden pro 50 ml 2 g PEG 8000 (Sigma) und 1,5 g NaCl (Sigma) gelöst, die Phagen 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 4000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS/0,1% BSA gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um noch vorhandene Zellreste zu entfernen, wurde nochmals für 5 min bei 12000 rpm (4°C) zentrifugiert und der Überstand – nach Abnahme von 10 µl für die Bestimmung des Phagentiters (*input*, siehe 3.4.6) – in die Selektion eingesetzt.

3.4.4 Selektion von antigenbindenden scFv-Phagen mittels Platten-Panning

Die Selektion von antigenbindenden-scFv wurde mit Hilfe der Methode des Platten-Pannings durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl eines PEG-biotinylierten hNKG2D-Antigens (1 µg/ml) (s. 3.7.1 und 3.8) in einer mit Streptavidin beschichteten ELISA-Platte (Nunc) über Nacht immobilisiert. Am nächsten Tag wurde das Antigen-Fluid entfernt, einmal mit

180 µl ultra pure Wasser gewaschen und die Platte für 1 h bei 37°C mit 180 µl 1x TBS/3% BSA geblockt. Für den Selektionsansatz wurden 250 µl scFv-Phagenlösung (in 1x TBS/1% BSA) auf fünf mit hNKG2D-Antigen immobilisierten Kammern der ELISA-Platte aufgeteilt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Phagenlösung abgezogen und zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen mit 180 µl 1x TBS-T/1% BSA gewaschen. Dieser Vorgang wurde je nach Selektionsrunde noch ein- bis neunmal wiederholt. Danach wurde die spezifische Bindung von scFv-Phagen an das Antigen durch Herabsetzen des pH-Wertes gelöst. In einem ersten Elutionsschritt wurden pro Kammer 50 µl Elutionspuffer (0,1 M HCl-Glycin pH 2,2) zugegeben, 10 min bei RT inkubiert und dann der Überstand abgenommen. Im diesem Eluat befanden sich nun die zuvor an Antigen gebundenen scFv-Phagen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch sofortige Zugabe von 2 M Tris-Base (pH 11) neutralisiert. Um auch besonders hochaffine Antigen-bindende scFv-Phagen zu eluieren, wurden pro Kammer 100 µl einer frisch angezogenen *E. coli* XL1-Blue-Kultur (in SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin, OD₆₀₀ ≈ 1) für 15 min bei RT zugegeben. Während dieser Zeit konnten scFv-Phagen die Bakterien infizieren. Die Bakterien wurden anschließend direkt zur reinfizierten Bakterien-Kultur (s. 3.4.5) pipettiert.

3.4.5 Infektion von *E. coli* XL1-Blue mit eluierten scFv-Phagen und erneute Phagenamplifikation

Das neutralisierte scFv-Phageneluat wurde zu 3 ml einer frisch angezogenen *E. coli* XL1-Blue-Kultur (in SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin, OD₆₀₀ ≈ 1) pipettiert und 15 min bei RT inkubiert, so dass eine Infektion der Bakterien durch die scFv-Phagen stattfinden konnte. Durch das in den scFv-Phagen verpackte pComb5BHis/N2-Plasmid erhielten die Bakterien eine Resistenz gegen Carbenicillin. Der Ansatz wurde nachfolgend mit SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 20 µg/ml Carbenicillin) auf 15 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des Output-Titers (s. 3.4.6) wurden der Kultur 11 µl entnommen (s. 3.4.6). Nach 1 h unter Schütteln bei 37°C wurde die Carbenicillin-Konzentration im Kulturansatz auf 50 µg/ml erhöht und eine weitere Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Kultur wurden nun 10¹² pfu VCSM13-Helferphagen zugegeben, kurz vermischt, das Kulturvolumen mit SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Carbenicillin) auf 100 ml erhöht und erneut 2 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) auf VCSM13-infizierte Bakterien selektiert. Während der darauf folgenden Inkubation von ca. 16 h erfolgte die Amplifikation der selektierten scFv-Phagen. Um eine weitere Selektionsrunde durchzuführen, wurden diese am nächsten Tag wiederum aus dem Medium isoliert und auf biotinyliertem Antigen selektiert. Die Infektion von *E. coli* XL1-Blue mit selektierten Phagen und die Amplifikation

der Phagen in einer erneuten Übernachtkultur beendeten diese weitere Selektionsrunde. Theoretisch sollte sich in jeder Selektionsrunde der Anteil an antigenspezifischen scFv-Phagen erhöhen. Um human NKG2D-spezifisch bindende scFv-Phagen anzureichern, wurden vier Selektionsrunden hintereinander durchgeführt.

3.4.6 Bestimmung des Input- und Output-Phagentiters

Zur Überwachung des Selektionsvorgangs während einer Phagen-Display-Selektion wurde sowohl die Anzahl an Phagen bestimmt, die in eine Selektionsrunde eingesetzt wurden (*input*), als auch die nach Selektion verbliebene Anzahl an Phagen (*output*).

Input-Titer:

Zur Bestimmung des Input-Titers wurden nach der Phagenfällung (s. 3.4.5) 10 µl Phagensuspension für eine Titerbestimmung entnommen. Ausgehend von diesen 10 µl wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe in LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) angesetzt. Von geeigneten Verdünnungsstufen (10^{-5} - 10^{-11}) wurden jeweils 10 µl zur Infektion von 90 µl *E. coli* XL1-Blue ($OD_{600} \approx 1$) eingesetzt. Nach 15 min bei RT wurden diese Ansätze auf Carbenicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Anzahl eingesetzter Phagen errechnet.

Output-Titer:

Zur Bestimmung des Output-Titers wurden einer *E. coli* XL1-Blue Kultur 11 µl nach Infektion mit selektierten Phagen (s. 3.4.5) entnommen. Nach zweimaligem Verdünnen um den Faktor zehn, wurden alle drei Verdünnungsstufen auf Carbenicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Anzahl eingesetzter Phagen errechnet.

3.4.7 FACS-Screening

3.4.7.1 Expression antigenspezifischer scFv und Periplasmapräparation

Zur löslichen Expression von scFv-Fragmenten wurden die VH/VL-Sequenzen in den Vektor pComb5BF/H/deIN2 (Micromet AG) umklontiert. Dieser erlaubte die periplasmatische Expression der Fragmente ohne Fusion an Phagengene. Für den Nachweis und die Aufreinigung waren die Fragmente jedoch C-terminal mit einer FLAG-Sequenz gefolgt von einer Hexahistidinsequenz (His_6) gekoppelt. Die periplasmatische Expression von scFv-Antikörpern und die Durchführung der Periplasmapräparation erfolgten nach zwei unterschiedlichen Protokollen in *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* TG1.

***E. coli* XL1-Blue:**

Hier wurde die Expression von scFv im 5 ml-Maßstab und die anschließende Periplasmapräparation nach der "Freeze & Thaw"-Methode durchgeführt: Nach Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien wurden Einzelkolonien gepickt und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Mit 10 µl dieser Suspension wurden 5 ml SB-Medium (5 µg/ml Carbenicillin, 20 mM MgCl₂) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln für 6 h inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die über den lac-Promotor gesteuerte Proteinproduktion induziert. Nach Übernachtsinkubation bei 30°C unter Schütteln wurden die Bakterien durch Zentrifugation (2000 rpm, 15 min, 4°C) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert und in einem EtOH/Trockeneis-Bad 5 min gefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieses Einfrieren und Auftauen wurde dreimal wiederholt, wodurch die äußere Bakterienmembran zerstört und scFv in den Überstand entlassen wurden. Die Zelltrümmer wurden bei 12000 rpm pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und vor dem Einsatz in Versuche mit Hilfe von Ni-NTA-Zentrifugationssäulen (s. 3.5.3) aufgereinigt.

***E. coli* TG1:**

Hier wurde die Expression von scFv in 96-well Platten und die Periplasmapräparation mit osmotischem Schock in Anwesenheit von Lysozym durchgeführt: Pro Well wurde eine Einzelkolonie mit Hilfe von Zahnstochern in hohe 96-Well-Platten (Volumen 1 ml) überführt. In den Platten waren 120 µl/Well LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml) und 1% Glucose vorgelegt. Diese Master-Platten (MP) wurden mit luftdurchlässiger Folie (Greiner) verklebt und über Nacht bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10 µl/Well aus der MP in eine neue Platte überführt (100 µl/Well LB-Carbenicillin/0,1% Glucose), die Platte mit luftdurchlässiger Folie verklebt und 4 h bei 37° kräftig geschüttelt. Dann wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und bei 30°C für weitere 18 h unter Schütteln inkubiert. Um das Periplasma aufzuschließen, wurden nun 40 µl/Well BBS-Puffer, der frisch mit Lysozym (2,5 mg/ml) supplementiert worden war, zugegeben. Die Platte wurde für 1 h bei RT geschüttelt und anschließend bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand konnte in eine neue Platte überführt und bei -20°C gelagert oder die Bindungsaktivität direkt mit Hilfe des FACS auf NKG2D-positiven Zellen getestet werden.

BBS-Puffer: 400 mM Borsäure, 320 mM NaCl, 4 mM EDTA, pH 8,0

3.4.7.2 Selektion antigenspezifischer scFv mittels FACS

Die Bindungsaktivität der im Periplasma enthaltenen scFv wurde mit Hilfe des FACS auf NKL-Zellen getestet. Hierzu wurden 2×10^5 NKL-Zellen pro Färbung aus der Zellkultur entnommen, für 5 min bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert und das Medium abgezogen. Das Zellpellet wurde in FACS-Waschpuffer (1x PBS/1% FCS/0,05% Natriumazid) resuspendiert (2×10^5 Zellen/200 µl) und je 200 µl der Zellsuspension in eine 96-Well Rundboden-Platte übertragen. Nach Zentrifugation (2 min, 1400 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in je 100 µl Waschpuffer aufgenommen und bis zur Zugabe von Lyseextrakt aus dem Periplasmaaufschluß bei 4°C gelagert. In dieser Zeit wurden die lysierten Expressionskulturen für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert (s. 3.4.7.1), anschließend 50 µl des Lyseüberstands auf die vorher abzentrifugierten Zellen pipettiert und für 0,5-1 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (2 min, 1400 rpm, 4°C) der Zellen mit FACS-Waschpuffer wurden diese mit 30 µl Anti-FLAG Antikörper (Sigma, 1:900 in Waschpuffer) für 0,5-1 h bei 4°C inkubiert. Die Detektion des an den FLAG-Marker der scFv gebundenen murinen Anti-FLAG Antikörpers erfolgte über einen Phycoerythrin (PE)-konjugierten Ziege Anti-Maus Antikörper (Dianova, 1:100 in Waschpuffer). Hierzu wurden die Zellen nach dem Waschvorgang (s. oben) mit 30 µl des Detektionsantikörpers für 0,5-1 h inkubiert, anschließend gewaschen, für die Untersuchung am FACS in je 200 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen übertragen.

3.4.7.3 Schrittweise Humanisierung

Da mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie zu den humanen VLs keine passende humane VH gefunden werden konnte, musste die VH des Anti-hNKG2D scFv schrittweise humanisiert werden. Hierzu wurden ausgehend von der murinen 6H7-VH drei unterschiedlich stark humanisierte VH-Fragmente entworfen, die von der Firma Entelechon synthetisch hergestellt wurden (humH7, FR1M und FR3M in einem pCR-Script-Amp^r-Vektor). Das Fragment humH7, in dem alle drei Frameworks (FR1-FR3) bis auf die CDR-Bereiche human sind, wurde über *SacI* und *XhoI* in den ebenfalls geschnittenen E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor kloniert. Das Fragment FR1M (80 bp), das einen murinen FRI und humane FRII und FRIII besitzt, wurde über *XhoI* und *BsiWI*, und das Fragment FR3M (220 bp), das einen murinen FRIII und humane FRI und FRII besitzt, über *SacI* und *BssHIII* in die jeweiligen Vektoren E1VLhumH7pComb5BF/HdeIN2 eingefügt, so dass drei verschiedene Konstrukte entstanden: E1VLhumH7-pComb5BF/HdeIN2 (HHH), E1VLhumH7FR1MpComb5BF/HdeIN2 (MHH) und E1VLhumH7FR3M-

pComb5BF/HdeIN2 (HHM). Diese wurden zur Herstellung von periplasmatischen Aufschlüssen (s. 3.4.7.1) in TG1-Zellen transformiert und die Bindung und die Fähigkeit zur Kompetition der unterschiedlich stark humanisierten Anti-hNKG2D scFv auf NKG2D⁺/DAP10⁺ CHO-Zellen am FACS getestet (s. 3.11.2.7 und 3.11.2.8). Für die weitere schrittweise Humanisierung des FRIII wurden vier verschiedene synthetische Konstrukte, die in unterschiedlichen Bereichen des FRIII zum ursprünglichen murinen Framework mutiert waren, von Entelechon hergestellt (H6A, H6B, H6C und H6D in pCR-4TOPO). Diese wurden über *SacI* und *BssHIII* in den E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor umkloniert. Anhand der FACS-Daten der Konstrukte humH7, humH7FR1M humH7FR3M, H6A, H6B, H6C und H6D wurde ein weiteres Konstrukt HHH+6 (in pCR-4TOPO-Vektor) von Entelechon synthetisch hergestellt und über *XhoI* und *SacI* in den E1VLpComb5BF/HdeIN2-Vektor (HHH+6) bzw. über *XhoI* und *BssHIII* in E1VLhumH6DpComb5BF/HdeIN2-Vektor (D/HHH+6) umkloniert. Die Bindungseigenschaft der Konstrukte wurde am FACS auf NKG2D positiven Zellen getestet. Durch das Einfügen weiterer Mutationen mittels PCR (s. 3.2.4) und Oligonukleotid-Primern (s. 2.7.3, S.43) an bestimmten Stellen im FRI, II und III wurde versucht, die Anzahl an Aminosäuren (As) von murinem Ursprung stetig zu verringern. Eine mit der Software Vector NTI ermittelte humane Sequenz mit nur 2 As murinen Ursprungs, die synthetisch hergestellt wurde (6H7VHhum), verlor jedoch vollständig ihre Bindungsaktivität. Durch Rückführung einzelner As von human nach murin mittels PCR (s. 3.2.4 und 2.7.3 S.44) wurde versucht, die Bindungsaktivität wieder herzustellen. Die Bindungseigenschaften der einzelnen Rückmutationen wurden in einem Streptavidin-ELISA auf biotinyliertem NKG2D getestet (s. 3.11.4.1).

3.5 Affinitätsmaturierung humaner Anti-hNKG2D Antikörper

3.5.1 Randomisierung der CDR3-Bereiche von VH und VL

Um die Affinität des humanen E1VLV71KVH Anti-hNKG2D Antikörpers zu verbessern, wurde sowohl die variable Region der leichten Kette (VL) als auch die variable Region der schweren Kette (VH) durch das Einfügen zufälliger Aminosäuresubstitutionen bzw. durch eine sogenannte Randomisierung oder Random-Mutagenese verändert. Innerhalb dieser variablen Regionen von VH und VL befinden sich jeweils drei kurze Peptidabschnitte von ca. 5 bis 20 Aminosäuren. Diese sechs hypervariablen Abschnitte bilden im nativen Protein die eigentliche Antigenbindungsstelle und werden auch als CDRs bezeichnet. Die CDRs 1 bis 3 bilden aufgrund der aus ihrer Aminosäuresequenz resultierenden räumlichen Struktur eine Kontaktfläche zum Epitop des Antigens und sind so maßgeblich an der Ausbildung der Spezifität eines Antikörpers beteiligt. Bei der Random-Mutagenese

wurde die Primärsequenz der CDR3-Region von VL und VH (11 As) mittels mehrere PCR-Schritte und synthetisch hergestellter Oligonukleotid-Primer (Abb. 35A) verändert. Im ersten PCR-Schritt wurden zunächst nur die CDR1- und CDR2-Bereiche amplifiziert, und eine Trunc-Version von VL und VH hergestellt. Diese diente in der nachfolgenden PCR, in der über die Verwendung von drei unterschiedlichen Primern die CDR3-Region mit unterschiedlich mutierten Bereichen wieder an den Trunc angefügt wurde, als Matrize. Zusätzlich wurden über die PCR-Schritte noch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angefügt (VL: *SacI/SpeI*; VH: *XhoI/BstEII*), über die eine Klonierung in den Phagen-Display-Vektor pComb5BHis/N2 ermöglicht wurde (Abb. 34 S. 150). Hierzu wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Ansatz:

- 2 µl DNA-Template
- 2 µl 10x Taq-Polymerase Puffer (Roche)
- 0,2 µl Forward-Primer (20 µM)
- 0,2 µl Reverse-Primer (20 µM)
- 0,16 µl dNTP (2 mM) (Fermentas)
- 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase (Roche)
- ad 20 µl H₂O

PCR-Zyklen:

1. Denaturierung	3 min	94°C	} 40 x
2. Denaturierung	50 sec.	94°C	
3. Primer-Anlagerung	50 sec.	52°C	
4. DNA-Polymerisation	50 sec.	72°C	
5. DNA-Polymerisation	5 min	72°C	

Die in drei unterschiedlichen Bereichen der CDR3-Region randomisierten und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten (s. 3.4.2.2) VL- und VH-Fragmente wurden in einem 2% Agarosegel quantifiziert (s. 3.1.8.2) und anschließend zu gleichen Teilen zusammengefügt. Die Ligation der PCR-Fragmente und des pComb5BHis/N2-Vektors erfolgte gemäß der Beschreibung in Abschnitt 3.3.3. Durch eine anschließende Selektion im Phagen-Display wurden schließlich solche Varianten gewonnen, welche die gewünschte Bindungsaktivität für das Antigen NKG2D aufwiesen.

3.5.2 Selektion von antigenspezifischen scFv-Phagen mittels in solution-Panning

Für die Selektion wurde die Methode des in solution-Panning gewählt, bei der die scFv-tragenden Phagen mit löslichem Antigen inkubiert werden. Diese Methode bietet gegenüber Ansätzen, bei denen das Antigen an einer ELISA-Platte immobilisiert wird, den Vorteil, dass die Konzentration des Antigens genau eingestellt und diese zur Selektion höher affiner scFv in den aufeinander folgenden Selektionsrunden schrittweise herabgesetzt werden kann. Für den Selektionsansatz wurden 500 µl scFv-Phagenlösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das über Nacht bei 4°C mit PBS/1% BSA blockiert worden war, und mit hNKG2D/Fc-Fusionsprotein versetzt. Die Endkonzentration des Antigens im Selektionsansatz betrug zwischen 0,1 nM und 100 nM. Das Gemisch wurde 1 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Um das Fc-gekoppelte Antigen zusammen mit daran gebundenen Phagen aus der Lösung isolieren zu können, wurden 30 µl Protein G-Beads (Sigma) zugesetzt und eine weitere Stunde unter denselben Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit wurden an das Antigen gebundene Phagen über die NKG2D/Fc-Protein G-Bindung letztlich an die Protein G-Beads gekoppelt. Die Protein G-Beads (mit NKG2D/Fc-Antigen und daran gebundenen scFv-Phagen) wurden nun zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen mit 1 ml 1x PBS/0,1% BSA gewaschen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde je nach Selektionsrunde noch ein- bis neunmal wiederholt. Danach wurde die spezifische Bindung von scFv-Phagen an das Antigen durch Herabsetzen des pH-Wertes gelöst. In einem ersten Elutionsschritt wurden die Protein G-Beads mit Antigen und Phagen in 200 µl Elutionspuffer (0,1 M HCl-Glycin pH 2,2) resuspendiert, 10 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert und dann für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die zuvor an Antigen gebundenen scFv-Phagen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch sofortige Zugabe von 2 M Tris-Base (pH 11) neutralisiert und zu 3 ml *E. coli* XL1-Blue-Kultur pipettiert. Um auch besonders affine Antigen-bindende scFv-Phagen zu eluieren, wurden die Protein G-Beads mit 200 µl einer frisch angezogenen *E. coli* XL1-Blue-Kultur (in SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin, OD₆₀₀ ≈ 1) für 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit konnten scFv-Phagen die Bakterien infizieren. Die Bakterien wurden anschließend direkt zur reinfizierten Bakterien-Kultur (s. 3.4.5) pipettiert.

3.5.3 Produktion und Aufreinigung kleiner scFv-Mengen über Ni-NTA Zentrifugationssäulen

Die Expression kleinerer Mengen an scFv erfolgte in *E. coli* wie unter 3.4.7.1 beschrieben. Die Aufreinigung der His₆-markierten scFv aus periplasmatischem Extrakt wurde mit Hilfe von Ni-NTA-Zentrifugationssäulen der Firma Qiagen durchgeführt. Um eine Degradation der Proteine zu vermeiden, wurde stets mit eiskalten Puffern gearbeitet. Zur Equilibrierung wurden 600 µl Puffer A auf die Säule pipettiert und 2 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationen erfolgten unter den gleichen Bedingungen. Ein ml periplasmatischer Extrakt wurde mit 20 µl Puffer A versetzt. Die Säule wurde zunächst mit 500 µl Proteinlösung aus dem Periplasmaaufschluß beladen und zentrifugiert. Nachfolgend wurde dieser Schritt mit dem restlichen Extrakt wiederholt. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit je 600 µl Waschpuffer wurde die Säule in ein frisches Auffanggefäß gegeben. Die Elution des scFv-Proteins erfolgte durch Zugabe von 200 µl Puffer B auf die Säule und anschließender Zentrifugation. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Die so aufgereinigten Anti-hNKG2D scFv wurden anschließend über Nacht in 5 L 1x PBS mit Hilfe von Mini Dialyse Einheiten (Pierce) umgepuffert. Von den umgepufferten scFv-Proben wurden je 60 µl für ein Proteingel abgenommen, in dem die Expressionsmenge der einzelnen scFv überprüft werden sollte, um später die Bindungsaktivitäten im FACS auswerten zu können. Diese 60 µl Proteinlösung wurden für das Proteingel mit 20 µl 4x LDS-Proben-Puffer (Invitrogen) und 10 µl 10x Proben-Reduktionsagens versetzt, für 3 min bei 95°C im Thermoblock inkubiert, bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert und schließlich je 20 µl der reduzierten Probe auf ein 4-12% Bis-Tris SDS-Gel aufgetragen (s. 3.9.1). Es wurden jeweils zwei identische SDS-Polyacrylamidgele erstellt: eines wurde zur Coomassie-Färbung (3.9.2) und eines für die Durchführung eines Westernblots zur Detektion His₆-markierter Proteine (3.9.4) verwendet.

Puffer A

20 mM Na₂HPO₄

400 mM NaCl

5 mM Imidazol, pH 7,0

Puffer B

20 mM Na₂HPO₄

400 mM NaCl

150 mM Imidazol, pH 7,0

Waschpuffer

20 mM Na₂HPO₄

400 mM NaCl

20 mM Imidazol, pH 7,0

3.6 Transfektion

3.6.1 Transiente Transfektion von HEK293-F-Suspensionszellen

Zur Produktion von Antikörpermolekülen oder des His₆-markierten humanen löslichen NKG2D-Proteins wurden HEK293-Suspensionszellen (Invitrogen) als eukaryotisches Expressionssystem verwendet. Für eine transiente Transfektion in 30 ml Volumen wurden 3×10^7 HEK293-Zellen bei 600-700 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 28 ml frisches serumfreies Freestyle 293 Expressionsmedium (Invitrogen) aufgenommen ($1,1 \times 10^6$ Zellen/ml), in einen frischen Schüttelkolben überführt und während der Herstellung von Lipid-DNA-Komplexen für jeden Transfektionsansatz bei 37°C orbital geschüttelt (100 rpm). Zur Präparation der Lipid-DNA-Komplexe wurden 30 µg der Plasmid-DNA mit 1 ml Opti-MEM-Medium (Invitrogen) vermischt. Zur Expression von Antikörpern wurden der Expressionsvektor für die leichte Kette (pEF-ADA) und der Expressionsvektor für die schwere Kette (pEF-DHFR) mit je 15 µg (1:1) kotransfiziert. Anschließend wurden 40 µl des 293fectin Reagenz (Invitrogen) in 1 ml Opti-MEM-Medium gegeben, vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach diesen 5 min wurden die beiden Ansätze zu einem Gesamtvolumen von 2 ml zusammengefügt, kurz vermischt und für 20-30 min bei RT inkubiert, um die Ausbildung von DNA-293fectin Komplexen zu ermöglichen. Diese gebildeten Komplexe wurden schließlich zu der bereits vorbereiteten 28 ml HEK293-Zellsuspension hinzu pipettiert. Für 60 ml Transfektionsansätze wurden die Anzahl der verwendeten Zellen und die Menge der verwendeten Reagenzien dementsprechend verdoppelt.

Zur Proteinexpression wurden die Zellen für drei Tage bei 37°C, 8% CO₂ und unter leichtem Schütteln (100 rpm) in einem Schüttelkolben kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (600-700 rpm, 5 min) aus dem Kulturmedium entfernt. Die Antikörper wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie über eine Protein G Säule und das His₆-markierte humane lösliche NKG2D-Protein mittels Metallaffinitätschromatographie (IMAC) und anschließender Gelfiltration aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.

3.6.2 Stabile Transfektion von CHO-dhfr⁻-Zellen

Im Gegensatz zu einer transienten Transfektion, bei der das Plasmid extrachromosomal vorliegt, wird bei einer stabilen Transfektion von eukaryotischen Zelllinien der eingebrachte Vektor im Verlauf der Replikation und Zellteilung in das Genom integriert und somit an die Tochterzellen weitergegeben.

Für die Produktion stabiler CHO-Doppel-Transfektanten wurden die folgenden zwei Selektionssysteme verwendet:

- Selektion mit DHFR (Dihydrofolatreduktase) als Selektionsmarker
- Selektion mit ADA (Adenosindeaminase) als Selektionsmarker

Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) ist ein Schlüsselenzym im C1-Stoffwechsel zahlreicher pro- und eukaryotischer Zellen. Das Enzym katalysiert die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat. Diese Reduktion ist sowohl für den Zellstoffwechsel als auch für die *de novo* DNA-Synthese essentiell. Beim DHFR-Selektionssystem erfolgen die ersten Selektionsschritte über die Zugabe von dialysiertem FCS, welches im Gegensatz zum normalen FCS keine Nukleotide mehr enthält, auf deren Zugabe jedoch untransfizierte DHFR-defiziente CHO (CHO-dhfr⁻)-Zellen angewiesen sind. Anschließend erfolgt ein zusätzlicher Selektionsdruck über Methotrexat (MTX). Dies ist ein Medikament, welches die Zellteilung hemmt, ein sogenanntes Zytostatikum. Es wirkt als Gegenspieler (Antimetabolit) der für die Zellteilung erforderlichen Folsäure; es wird daher auch als Folsäure-Antagonist bezeichnet. Durch ein viel höheres Bindungsvermögen des Methotrexats an das Enzym DHFR kommt es zu einer Hemmung der Nukleinsäuresynthese. Durch den Einsatz von MTX wird der Selektionsdruck auf Zellen mit erfolgreicher pEF-DHFR-Vektor-Transfektion erhöht. Nur Zellen, die den Vektor erfolgreich in ihr Genom integriert haben und daher ausreichend DHFR produzieren können, sind in der Lage, trotz MTX ausreichend Nukleinsäure zu synthetisieren und erhalten somit einen klaren Selektionsvorteil. Mit der Erhöhung der DHFR Produktion durch Selektion mit MTX erfolgt eine erhöhte Transkription des eingebauten Ziel-Gens, da beide Gene unter der Kontrolle des gleichen Promotors stehen, eine sogenannte bicistronische Proteinexpression.

Das Enzym Adenosindeaminase (ADA) spielt eine wichtige Rolle beim AMP-Stoffwechsel und katalysiert dort die Umsetzung von Adenosin zu Inosin. Die Selektion erfolgt hierbei über die Zugabe von 1x AAU und dCF (Desoxycoformicin oder Pentostatin). Das im AAU enthaltene L-Alanosin zwingt die Zellen hierbei durch Hemmung alternativer AMP-Synthesestoffwechselwege dazu, das in toxischen Konzentrationen vorliegende Adenosin über die Adenosinkinase in AMP abzubauen. Ein weiterer Selektionsdruck wird über die Zugabe von dCF ins Medium aufgebaut. Dies ist wie MTX ebenfalls ein Zytostatikum und wirkt als Purin-Antimetabolit. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zum Nukleosid Adenosin inhibiert es das Enzym ADA, und somit die Herstellung von DNA durch die Zelle. So können nur Zellen überleben, die aufgrund der Aufnahme des pEF-ADA Expressionsvektors und somit einer weiteren Kopie eines

ADA-Gens in der Lage sind, trotz des Inhibitors dcF ausreichende Mengen an ADA zu produzieren.

Zur Herstellung stabiler speziesspezifischer NKG2D- und DAP10-tragender oder Anti-human NKG2D Antikörper-produzierender CHO-Doppel-Transfektanten wurden insgesamt 100 µg DNA der Expressionsplasmide pEF-ADA (DAP10 bzw. leichte Kette des Antikörpers) und pEF-DHFR (NKG2D bzw. schwere Kette des Antikörpers) pro Ansatz im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Hierzu wurden pro Transfektionsansatz ca. 2×10^7 CHO-dhfr⁻ Zellen in 800 µl RPMI-Medium ohne Zusätze mit 100 µg Plasmid-DNA resuspendiert, in eine Elektroporationsküvette (Biorad) transferiert und die DNA über Elektroporation mit Hilfe eines Gene Pulser II-Gerätes (Biorad) (260 V, 975 µF, t = 20-25, High Cap 500 V max) in die Zellen eingebracht. In der ersten Selektionsrunde (2-3 Wochen) wurden die Zellen adhärenent in 25 ml RPMI-Medium mit 10% dFCS und Penicillin/Streptomycin (PS) in beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Danach wurden die adhärenenten Zellen langsam durch Herabsetzung dFCS-Konzentration und der Verwendung von HyQ-Suspensionsmedium in Suspension gebracht. Hierzu wurden die Zellen je einmal mit HyQ-Medium/1x AAU/PS/5% dFCS, HyQ-Medium/1x AAU/PS/2% dFCS und HyQ-Medium/1x AAU/PS/0,1 µM dCF passagiert. Bei jeder Passage wurde das Medium mit sich ablösenden Zellen abgenommen und verwahrt. Die restlichen adhärenenten Zellen wurden zunächst mit 10 ml 1x PBS gewaschen und für 5 min mit 1x PBS/Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im Inkubator vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe der verwahrten Zellsuspension mit 10-5% dFCS gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden für 5 min bei 1400 rpm abzentrifugiert und zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor sie in frisches Medium der nächsten Selektionsrunde aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Zellen zur Stabilisierung der Transfektion zwei Amplifikationsrunden unterzogen. In der ersten Amplifikation wurden die pEF-DHFR/pEF-ADA-Doppel-Transfektanten in HyQ-Medium/1x AAU/PS/20 nM MTX/0,3 µM dCF und in der zweiten Amplifikationsrunde in HyQ-Medium/1x AAU/PS/100 nM MTX/1 µM dCF kultiviert.

Die Produktion der IgG Antikörper im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des FACS auf NKG2D positiven NKL-Zellen kontrolliert (s. 3.11.2.7). Die Expression von speziesspezifischem membranständigem His₆-markiertem NKG2D und FLAG-markiertem DAP10 auf transfizierten CHO-Zellen wurde im FACS überprüft (s. 3.11.2.4).

3.7 Eukaryotische Proteinexpression und –aufreinigung

3.7.1 Aufreinigung von humanem löslichem NKG2D-His über IMAC

Zur Produktion von His₆solhNKG2D wurde das entsprechende Expressionsplasmid (His₆solhNKG2D in pEF-DHFR Vektor) in HEK293-F Suspensions-Zellen transferiert (s. 3.6.1). Die Aufreinigung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand erfolgte über die Methode der immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) an einem Äkta FPLC System und nachfolgender Gelfiltration. Eine Prosep-Säule wurde mit Puffer A equilibriert und 80 ml Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule geladen. Um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen, wurde die Säule nachfolgend mit fünffachem Säulenvolumen (5 CV) an 10% Puffer B gewaschen. Danach wurde gebundenes Protein mit Hilfe von 5 CV an 100% Puffer B von der Säule eluiert und in Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt.

Puffer A 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7)
 400 mM NaCl

Puffer B 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7)
 400 mM NaCl
 500 mM Imidazol

An die Metall-Affinitätschromatographie schloss sich als zweiter Aufreinigungsschritt eine Gelfiltration an. Hierbei wird ein Proteingemisch entsprechend seiner Größe aufgetrennt. Die Gelfiltration wurde mit einer HiLoadTM 16/60 Superdex Säule (GE Healthcare) durchgeführt, die zuvor mit PBS equilibriert worden war. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Vor der Aufreinigung war die Säule mit Hilfe eines Molekulargewicht Marker Kits (Sigma) kalibriert worden. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels BCA Protein-Assay (s. 3.9.6). Mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung des Gels wurde die Reinheit des aufgereinigten Proteins untersucht.

3.7.2 Aufreinigung der Antikörper über eine Protein G HP-Säule

Zur Produktion von humanen Anti-hNKG2D Antikörper wurden Antikörper-produzierende CHO-Zellen der ersten oder zweiten Amplifikationsrunde für ca. eine Woche in 500 ml des jeweiligen Mediums in Rollerflaschen bei 37°C im Brutschrank kultiviert (s. 3.6.2). Die Aufreinigung ganzer Antikörper aus CHO-Zellkulturüberstand wurde an einem Proteinaufreinigungsgerät ÄKTAexplorer 100 Air (Amersham Bioscience) mit Hilfe einer HiTrap 5 ml Protein G HP-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Die Säule wurde hierfür

zunächst mit sieben Säulenvolumen (7 CV) eines Wasch- bzw. Equilibrierungs-Puffers (20 mM Tris in Ampuwa-Wasser, pH 7) mit einer Flussrate von 2 ml/min equilibriert. Anschließend wurden 400 ml des Zellkulturüberstandes (Gesamtvolumen: 1400 ml) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min injiziert und die Säule danach mit 6 CV Waschpuffer (Flussrate: 2 ml/min) gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch die Injektion von 5 CV Elutions-Puffer (20 mM Citrat in Ampuwa-Wasser, pH 3). Das Eluat wurde mit einem Neutralisations-Puffer (1M Tris in Ampuwa-Wasser, pH 8) neutralisiert, das zuvor in die Auffangröhrchen des Fraktionskollektors pipettiert worden war (pro 1 ml Eluat 100 µl Neutralisations-Puffer). Für einen neuen Durchlauf musste die Säule wieder reequilibriert werden. Nach dem Aufreinigungprozeß wurde die Säule mit einem Säulen-Waschpuffer (5 M Guanidiniumchlorid, 20 mM Tris in Ampuwa-Wasser) gewaschen, bis die Baseline wieder erreicht wurde und danach in Lagerungs-Puffer mit 20% Ethanol aufbewahrt. Die Reinheit der Antikörper wurde anschließend in einem Proteingel untersucht (s. 3.9.1 und 3.9.2) und die Proteinkonzentration photometrisch über eine OD₂₈₀-Messung bestimmt (s. 3.9.5).

3.8 PEG-Biotinylierung von humanem löslichem NKG2D-Protein, ULBP-2Fc- und CD25Fc-Protein

Für die Selektion antigenspezifisch-bindender scFv-Phagen mit der Methode des Platten-Pannings auf Streptavidin-Platten (Nunc) wurde ein biotinyliertes lösliches humanes NKG2D-Protein benötigt. Hierzu wurde ein über IMAC aufgereinigtes His₆solhNKG2D (s. 3.7.1) mit einem vierfachen Überschuß an PEG-Biotin (Nektar) konjugiert.

Zur PEG-Biotinylierung von 250 µg des His₆solhNKG2D (1×10^{-8} Mol) wurden 136 µg PEG-Biotin (4×10^{-8} Mol) benötigt (s. Berechnungen). Die beiden Komponenten wurden in einem Plastikröhrchen vorsichtig miteinander vermischt, anschließend für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln auf einem Wipptisch inkubiert. Die Effizienz der Biotinylierung des NKG2D-Proteins wurde mit Hilfe eines Streptavidin-ELISA überprüft (s. 3.11.4.1). Die biologische Aktivität des biotinylierten NKG2D-Proteins wurde am FACS über die Detektion der Bindung an BaF/3-hMICA- bzw. BaF/3-hULBP-2-Zellen kontrolliert (s. 3.11.2.2).

Für die Untersuchung der Neutralisierungs-Fähigkeit von humanen Anti-hNKG2D Antikörpern wurden der NKG2D-Ligand ULBP-2Fc und das Kontroll-Protein CD25Fc ebenfalls biotinyliert, da hier der Nachweis der Bindung aufgrund der Verwendung eines humanen Anti-hNKG2D Antikörpers nicht über den Fc-Teil erfolgen konnte. Auch hier wurde die PEG-Biotinylierung im Streptavidin-ELISA und die Bindung auf CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Zellen überprüft.

Berechnung der Ansätze:

$$n = m/M$$

n: Stoffmenge eines Stoffes (Mol)

m: Masse eines Stoffes (g)

M: molare Masse eines Stoffes (g/mol)

His₆solhNKG2D: MW = 25 000 Da (g/mol)

$$n = 250 \mu\text{g} / 25\,000 \text{ g/mol} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ g} / 25\,000 \text{ g/mol} = \underline{1 \cdot 10^{-8} \text{ Mol}}$$

vierfache molare Menge an PEG-Biotin: $4 \times 10^{-8} \text{ Mol}$; MW 3400 Da (g/mol)

$$m = n \times M = 4 \times 10^{-8} \text{ Mol} \times 3400 \text{ g/mol} = \underline{136 \mu\text{g}}$$

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Hierzu wurde eine aufzutrennende Proteinlösung von 60 μl mit 20 μl Probenpuffer (NuPAGE LDS Proben-Puffer 4x, Invitrogen) sowie 10 μl Reduktions-Agens (NuPAGE Sample Reducing Agent 10x, Invitrogen) versetzt und die Lösung für 3 min auf 95°C erhitzt. Bei Ladung von Proben nach der Proteinaufreinigung mussten bestimmte Fraktionen wie Zellkulturüberstand, Durchlauf und die einzelnen Peaks aus der Gelfiltration zunächst von 300 μl mit Hilfe von Aufkonzentrierungsgefäßen (PALL) und Zentrifugation für 5-6 min bei 10000 rpm bei 4°C auf 60 μl aufkonzentriert werden. Die Auftrennung der Proteine (30 μl) erfolgte auf einem Bis-Tris-Gel 4-12% (NuPage, Invitrogen) für 35 min bei 200 V konstant. Als Laufpuffer diente NuPAGE MES SDS Laufpuffer (Invitrogen). Als Größenstandard wurde der Multimark Standard (Invitrogen) verwendet.

3.9.2 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-Page

Bei der Coomassie-Färbung von SDS-Gelen wurden diese zunächst dreimal für 5 min mit ultra pure Wasser (Biochrom) gewaschen, nachfolgend in Simply Blue SafeStain Lösung (Invitrogen) für mindestens 1 h bei RT auf einem Wipptisch inkubiert und schließlich für ca. eine Stunde oder über Nacht in Wasser gewaschen.

3.9.3 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-Page

Die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde mit Hilfe des SilverXpress Silver Staining Kits von Invitrogen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde das Gel nacheinander mit den verschiedenen Lösungen zur Fixierung (10 min), Sensitivierung (30 min), Färbung (15 min) und Entwicklung (3-15 min) inkubiert und die Farbreaktion letztlich durch Zugabe der Stopplösung beendet. Nach Sensitivierung, Färbung und Abstoppen

der Färbung wurde das Gel jeweils in Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in einer Geltrockenvorrichtung getrocknet.

3.9.4 Westernblot

3.9.4.1 Anti-His Detektion von His₆-markierten scFv

Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-Page wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (PALL) transferiert. Dies erfolgte mit einer Nassblot-Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad) zwischen in Transferpuffer (NuPage Transferpuffer substituiert mit 10% Methanol und 1 ml NuPAGE Antioxidant, Invitrogen) getränktem Whatman-Filterpapier (60 min, 30 V). Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese über Nacht mit PBS/2% BSA abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des Detektions-Antikörpers an die Membran zu vermeiden. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal in PBS/0,3% BSA gewaschen. Zur Detektion von His₆-markierten Proteinen wurde ein Gemisch aus einem Biotin-konjugiertem Anti-Penta His Antikörper (Qiagen) und einer an Streptavidin gekoppelten Alkalischen Phosphatase (AP) (Sigma) verwendet. Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden zunächst 30 µl Streptavidin-AP in 13,5 ml 1x PBS aufgenommen, gemischt und unter Schütteln 7,5 µl eines biotinylierten Anti-Penta His Antikörpers zugegeben. Nach 15 min Inkubation von Antikörper mit dem Streptavidin-AP wurden 1,5 ml 1x PBS/2% BSA dazu pipettiert und damit die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT auf einem Wipptisch inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 1x PBS/0,2% BSA/0,1% Tween-20 wurde die Nitrozellulosemembran ein weiteres Mal kurz mit 1x PBS/0,2% BSA gewaschen und schließlich mit 5 ml des Substrats BCIP/NBT (Sigma) überschichtet. Nach ausreichender Farbentwicklung (nach ca. 15-30 min) wurde die Membran am Geldokumentationsgerät photographiert.

3.9.4.2 Anti-His Detektion von His₆solhNKG2D

Hierbei wurden die Proteine wie oben bereits beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht mit 4% Skim Milk (Fluka) in PBS/0,05% Tween 20 (PBS-T) abgesättigt und am nächsten Tag dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion des His₆-markierten Proteins wurde in einem ersten einstündigen Inkubationsschritt die Membran mit 1 µg/ml Anti-Penta His Antikörper (Quiagen) in PBS-T/1% BSA (PBS-TB) behandelt. Nach drei Waschschritten mit PBS-T erfolgte eine zweite Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Ziege Anti-Maus Antikörper (Jackson/Dianova, 1:50000 in PBS-TB) für eine Stunde auf

dem Wipptisch. Schließlich wurde die Membran, nachdem dreimal mit PBS-T gewaschen worden war, für die Proteindetektion über Enhanced Chemiluminescence (ECL) 1:1 mit den beiden Lösungen SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer (Pierce) und SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Puffer (Pierce) für 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Die abgetropfte Membran wurde anschließend in eine Folie gelegt und die restliche Flüssigkeit durch Ausstreifen entfernt. Das bei der ECL-Reaktion freigesetzte Licht wurde in einer Dunkelkammer, in einer Filmkassette (Kodak) auf einen Röntgenfilm (Kodak) übertragen. Dieser belichtete Film wurde mit einem Röntgenfilmprozessor vom Typ Optimax (MS Laborgeräte) entwickelt, die dunklen und somit belichteten Stellen auf dem Film entsprachen hierbei dem über Anti-His Antikörper und HRP-konjugiertem Antikörper detektierten Protein.

3.9.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über OD₂₈₀-Messung

Die Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Antikörpern erfolgte über die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm und den mittels Vector-NTI Software ermittelten proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten (1A[280]corr). Zur Berechnung des Proteingehaltes wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c \text{ (mg/ml)} = 1A[280]corr. \times OD_{280}$$

Für eine relativ genaue Bestimmung der Antikörperkonzentration wurden neben der OD₂₈₀ auch die OD₂₆₀ und OD₃₂₀-Werte gemessen. Als Leerwert wurde hierfür der jeweilige Puffer verwendet, in dem sich der Antikörper befand (meist Citrat-Tris-Puffer). Bei einem OD₂₈₀/OD₂₆₀-Verhältnis < 1,5 musste der OD₂₈₀-Wert über folgende Berechnungsformeln korrigiert werden.

Berechnung der korrigierten OD₂₈₀:

$$A = [(OD_{280}/OD_{260}) - 0,535] / 0,655$$

$$B = (OD_{280}/OD_{260}) / A$$

$$C = OD_{280} / B = \text{korrigierter OD}_{280}\text{-Wert}$$

3.9.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay

Die Proteinkonzentration von His₆ löslichem humanem NKG2D wurde mit Hilfe eines Micro BCA (Bicinchoninsäure bzw. Bicinchoninc acid) Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt. Der BCA-Test beruht auf zwei Reaktionsschritten, der Reduktion von Cu⁺² zu

Cu^{+1} durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und der Ausbildung eines BCA- Cu^{+1} -Komplexes, und dient zur quantitativen photometrischen Proteinbestimmung. Die Intensität der Farbe des Chelatkomplexes ist proportional zur Anzahl der an der Reaktion beteiligten Peptidbindungen und kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden. Bei der Durchführung wurde in einer ELISA-Platte von einem IgG-Proteinstandard (Biorad) und der Proteinlösung (His₆solhNKG2D in PBS) eine 1:2-Verdünnungsreihe (Anfangskonz.: 20 µg/ml) (Duplikate) in PBS erstellt. Dann wurde der Reagenz-Mix (Pierce) für den BCA-Assay frisch angesetzt und davon 100 µl in jedes Well pipettiert. Die ELISA-Platte wurde nach Zugabe des BCA-Mix für 1-2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei 562 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration des His₆solhNKG2D wurde anhand des IgG-Proteinstandards und einer Eichgeraden ermittelt.

Reagenz-Mix für BCA:

Reagenz A (MA): 25 Teile

Reagenz B (MB): 24 Teile

Reagenz C: 1 Teil

3.10 Zellkultur

3.10.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Lebendzellzahl von Zelllinien und Primärzellen wurde mit Hilfe einer Trypanblau- oder Eosin-Vitalfärbung durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Farbstoffe, die nur die permeable Membran toter Zellen durchdringen können. Diese Methode eignet sich deshalb besonders gut zur Bestimmung der Vitalität von Zellkulturen. Einer Zellsuspension wurde hierzu eine kleine Probe entnommen und diese meist 1:10 verdünnt. Die verdünnte Zellsuspension wurde anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm; Kammerfaktor: 10⁴) aufgetragen und die Zellzahl pro ml nach Herstellervorschrift und folgender Formel bestimmt.

Formel: $x = \text{Zellzahl}_{16\text{er-Feld}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$

3.10.2 Isolation von PBMCs aus Humanblut

Humane PBMCs wurden über einen Ficoll-Dichtegradienten aus heparinsiertem Humanblut gesunder Spender isoliert. Hierzu wurden 15 ml Ficoll-Separationsmedium (Biochrom) in ein 50 ml Leucosep®-Röhrchen (Greiner) pipettiert und bei 1000 rpm für 30 sec. unter die Separations-Fritte des Röhrchens zentrifugiert. Jedes Leucosep-Röhrchen

wurde bis zur 35 ml Marke mit Humanblut überschichtet und bei RT und 2200 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der dabei entstehende Dichtegradient ermöglichte die Auftrennung von Erythrozyten und Leukozyten. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde ein Teil des über der Fritte stehenden Serums bis knapp über dem PBMC-Ring abgesaugt. Jeweils zwei Leukozyten-Ringe wurden in einem 50 ml Zellkulturröhrchen zusammengefasst und mit kaltem 1x PBS/2% FCS aufgefüllt, durch vorsichtiges Invertieren vermischt und für 6 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem ersten Waschschrift wurden die restlichen Erythrozyten im PBMC-Pellet mit Hilfe eines Erythrozyten-Lyse-Puffers entfernt. Hierbei wurden jeweils zwei PBMC-Pellets in 5 ml Lyse-Puffer resuspendiert, für max. 5 min bei RT inkubiert und mit kaltem 1x PBS/2% FCS aufgefüllt, invertiert und zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 6 min). Die Zellen eines Spenders wurden schließlich in einem Röhrchen zusammengefasst und nochmals gewaschen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die PBMCs in 30 ml kaltem 1x PBS/2% FCS resuspendiert, 20 µl dieser Zellsuspension abgenommen und mit 180 µl Eosin oder Trypanblau gefärbt (1:10-Verdünnung). Aus diesen isolierten PBMCs wurden mit Hilfe eines negativen Isolationskits (DynaL Biotech, Invitrogen) primäre NK-Zellen gewonnen (s. 3.10.4).

3.10.3 Isolation von PBMCs aus Primatenblut

Für die Generierung von NKG2D⁺/DAP10⁺-CHO-Transfektanten unterschiedlicher Spezies wurde aus der RNA von Primaten-PBMCs cDNA gewonnen (s. 3.1.1 und 3.1.3) und diese als Matrize zur Gewinnung der speziesspezifischen NKG2D- und DAP10-Sequenzen verwendet.

Zur Isolation der PBMCs aus *M. mulatta*- und *M. fascicularis*-Blut (Primatenzentrum, Göttingen) wurden jeweils 50 ml Blut 1:1 mit sterilem 1x PBS (Biochrom) vermischt und auf mit Ficoll-Separationsmedium vorbereitete 50 ml Leucosep-Röhrchen (s. 3.10.2) verteilt. Für die Isolation der PBMCs aus *C. jacchus*-Blut (Primatenzentrum, Göttingen) wurden jeweils 2 ml Blut ebenso 1:1 mit sterilem 1x PBS vermischt und auf ein vorbereitetes 15 ml Leucosep-Röhrchen (2,4 ml Ficoll-Separationsmedium) überführt. Die Aufreinigung der Primaten-PBMCs war ansonsten mit der Isolation von humanen PBMCs identisch.

3.10.4 Aufreinigung von primären NK-Zellen aus PBMCs mittels Magnetbeads

Die Isolation von humanen primären NK-Zellen für Stimulationsversuche erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll eines negativ Isolationskits (DynaL Biotech, Invitrogen) mittels Magnetkügelchen (Magnetbeads).

Hierzu wurden 1×10^7 - 5×10^8 PBMCs in ein Rundboden-Röhrchen überführt und mit kaltem $1 \times \text{PBS}/0,1\%$ BSA auf eine Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. Zu je 1×10^7 PBMCs wurden $20 \mu\text{l}$ h.i. FCS und $20 \mu\text{l}$ Antikörper-Mix zugegeben und der Reaktionsansatz für 30-45 min bei 4°C im Kühlschrank unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 1×10^7 Zellen zweimal mit 2 ml kaltem $1 \times \text{PBS}/0,1\%$ BSA (bei 5×10^8 Zellen mit max. 40 ml Waschpuffer) durch Zentrifugation bei 4°C für 5 min und 1500 rpm gewaschen. Während des Waschvorgangs der Zellen wurden pro 1×10^7 PBMCs $100 \mu\text{l}$ Magnetkügelchen in ein 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit einer entsprechenden Menge an kaltem $1 \times \text{PBS} /0,1\%$ BSA mit einem Magneten (MPC-50, Invitrogen) gewaschen. Hierzu wurde das Röhrchen für 1 min im Magneten plaziert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Die gewaschenen magnetischen Beads wurden anschließend wieder im Ausgangsvolumen mit kaltem $1 \times \text{PBS}/0,1\%$ BSA resuspendiert. Je 1×10^7 gewaschene Zellen wurden in $950 \mu\text{l}$ kaltem $1 \times \text{PBS}/0,1\%$ BSA aufgenommen, $50 \mu\text{l}$ gewaschene Magnetkügelchen zugegeben und für 15 min bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die mit Magnetkügelchen benetzten Zellen vorsichtig mit einer 5 ml Pipette resuspendiert und das Volumen mit $1 \times \text{PBS}/0,1\%$ BSA bei 1×10^7 PBMCs um $500 \mu\text{l}$ erhöht (max. 35 ml). Die mit den Beads konjugierten Zellen wurden im Magneten plaziert und für 2 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt, nochmals $50 \mu\text{l}$ Beads pro 1×10^7 Zellen zugegeben und ein weiteres Mal für 15 min bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert. Schließlich wurde die mit Beads versetzte Zellsuspension zweimal für 5 min bei 4°C im Magneten plaziert. Der Überstand mit den darin enthaltenen NK-Zellen wurde in ein neues 50 ml Röhrchen transferiert und bei 4°C für 5 min und 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Waschpuffer resuspendiert und zur Zellzahlbestimmung (s. 3.10.1) von der Zellsuspension $50 \mu\text{l}$ entnommen und mit $50 \mu\text{l}$ Eosin oder Trypanblau vermischt.

3.10.5 Stimulation von NK-Zellen für Microarray, semiquantitative RT-PCR und Proteinexpressionsanalysen

Für die Analyse der Genexpression nach Stimulation mit NKG2D-Liganden mittels Microarray oder semiquantitativer RT-PCR bzw. für Proteinexpressionsanalysen wurden die aus PBMCs isolierten humanen NK-Zellen (s. 3.10.4) zunächst für 2 Tage in NKL-Medium (RPMI/10% h.i. FCS/PS/200 U/ml rek. humanes IL-2) in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml kultiviert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Medium (RPMI/10% h.i. FCS/PS) gewaschen und für 1 h bei 37°C im Medium belassen, um das restliche IL-2 aus dem NKL-Medium zu entfernen. Nach zwei weiteren Waschgängen wurden die Zellen dann zur NKG2D-spezifischen Stimulation auf Zellkulturplatten verteilt (4×10^6 Zellen pro well, Zelldichte: 5×10^5 Zellen/ml), auf denen zuvor NKG2D-Liganden immobilisiert waren.

Hierzu wurden pro Spender je zwei Kammern einer 6-Well-Platte über Nacht bei 4°C mit CD25/Fc, ULBP-1/Fc (R&D Systems, 10 µg/ml in 700 µl PBS) oder reinem 1x PBS beschichtet. Für die Genexpressionsanalysen (Microarray, semiquantitative RT-PCR) wurden die humanen NK-Zellen nach 2 h Stimulation mit den NKG2D-Liganden geerntet und für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Überstände der einzelnen Proben wurden für Zytokin/Chemokin-Analysen mittels CBA (TNF α , IFN γ , IL-8) (s. 3.11.2.3) und ELISA (GM-CSF, CCL3, CCL4) (s. 3.11.4.2/3) verwahrt. Die Zellen (8×10^6 Zellen pro Stimulationsansatz) wurden für RNA-Präparationen (s. 3.1.1) in 600 µl RLT-Puffer aufgenommen. Für Proteinexpressionsanalysen wurden die NK-Zellen für 24 h stimuliert und danach im FACS auf Expression bestimmter Oberflächenmoleküle getestet (s. 3.11.2.1 A).

3.10.6 Stimulation von NK-Zellen für funktionelle Anti-hNKG2D Antikörper Studien

Für die Untersuchung der Stimulations- und Inhibierungseigenschaften von Anti-hNKG2D-Antikörpern wurden die aus PBMCs isolierten humanen NK-Zellen (s. 3.10.4) zunächst für 2 Tage in NKL-Medium (RPMI/10% h.i. FCS/PS/200 U/ml rek. humanes IL-2) in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml kultiviert. Die Fähigkeit zur Inhibierung der NKG2D-vermittelten Stimulation wurde mittels MICA/Fc bzw. ULBP-1/Fc-beschichteten 96-Well-Platten (R&D Systems, 10 µg/ml in PBS, 4°C über Nacht) ermittelt. Zur Analyse der Induktion einer NKG2D-abhängigen Stimulation von humanen NK-Zellen über Anti-hNKG2D-Antikörper (E1VLV71KVH, B1VLB6VH, E4VLG10VH), wurden diese und ein human-IgG/Fc Antikörperfragment (Kontrollprotein) mit einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS über Nacht bei 4°C in einer 96-Well-Platte immobilisiert.

Nach Ablauf der Kultivierungsdauer wurden die Zellen zweimal mit Medium (RPMI/10% h.i. FCS/PS) gewaschen und für 1 h bei 37°C im Medium belassen, um das restliche IL-2 aus dem NKL-Medium zu entfernen. Nach zwei weiteren Waschgängen wurden die Zellen dann zur NKG2D-spezifischen Stimulation auf die zuvor beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten verteilt (1×10^5 Zellen/Well, Zelldichte: 5×10^5 /ml). Um die Fähigkeit der Anti-hNKG2D-Antikörper zu analysieren, eine NKG2D-spezifische Stimulation der humanen NK-Zellen über MICA- bzw. ULBP-1/Fc-Protein inhibieren zu können, wurden die humanen NK-Zellen vor Zugabe in die mit NKG2D-Liganden beschichteten Platten mit unterschiedlichen Anti-hNKG2D-Antikörpern (5 µg/ml in Medium) (E1VLV71KVH, B1VLB6VH, E4VLG10VH) oder deren Isotyp-Kontrollen für 30 min bei RT behandelt.

Nach ca. 20 h wurden die Zellkulturüberstände und die Zellen geerntet. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand für den CBA-Assay

(TNF α , IFN γ , IL-8) (s. 3.11.2.3) und ELISA (GM-CSF, CCL3, CCL4) (s. 3.11.4.2/3) verwahrt. Die humanen NK-Zellen wurden für eine CRTAM-Färbung im FACS verwendet (3.11.2.1 A).

3.10.7 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien

Zur Lagerung eukaryotischer Zellen wurden diese in einer Konzentration von $2-5 \times 10^6$ /ml in 1 ml Einfriermedium (h.i. FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) im Flüssigstickstoff-Tank aufbewahrt. Hierzu wurde eine entsprechende Menge an Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in einem entsprechenden Volumen an Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrier Röhrchen überführt. Die im Einfriermedium befindlichen Zellen wurden direkt für einige Minuten auf Eis gestellt, um eine Beschädigung der Zellen durch das bei RT toxische DMSO zu vermeiden. Die Zellaliquots wurden anschließend für 1-2 Tage bei -80°C gelagert und schließlich in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt. Empfindliche Zellen wurden zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox für eine Nacht bei -80°C eingefroren. Das Isopropanol bewirkt dabei einen graduellen Temperaturabfall und sorgt somit für einen schonenden Gefriervorgang. Die Röhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden anschließend ebenfalls zur weiteren Lagerung in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt. Zur Reaktivierung der Zellen wurden in einem 15 ml Zellkultur Röhrchen 5 ml h.i. FCS langsam mit 5 ml Zellmedium überschichtet, die Zellen so schnell wie möglich unter heißem Wasser aufgetaut und direkt in das vorbereitete Zellkultur Röhrchen mit FCS und überschichtetem Medium überführt. Dann wurde die Zellsuspension bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert.

3.11 Funktionelle Tests mit Anti-hNKG2D Antikörpern

3.11.1 Untersuchung der Bindungskinetik im Biacore

Zur Bestimmung der Affinität wurden Oberflächenplasmonresonanz-Messungen (Surface Plasmon Resonance, SPR) an einem BIAcore™ 2000 (Biacore) durchgeführt. Mit dieser Methodik können über spezielle Biosensoren Wechselwirkungen zwischen interagierenden Proteinen untersucht werden. Bei diesen Biosensoren handelt es sich um optische Massendetektoren, welche die Interaktion zwischen einem immobilisierten Liganden und einem Analyten in der Flussphase messen. Die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_d) der Analyte können hierbei getrennt ermittelt werden und mit Hilfe unterschiedlicher Analytkonzentrationen kann daraus die Dissoziations-Gleichgewichtskonstante K_D berechnet werden (Abb. 10).

Der verwendete CM5-Sensorchip ist ein Glasträger, der mit einem Goldfilm beschichtet ist. Dieser Goldfilm trägt eine Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche, an die nach deren Aktivierung der Analyt immobilisiert werden kann. Bei nachfolgender Anlagerung eines Liganden werden die daraus resultierenden Veränderungen der optischen Eigenschaften der Chipoberfläche durch die Veränderungen des refraktiven Index gemessen.

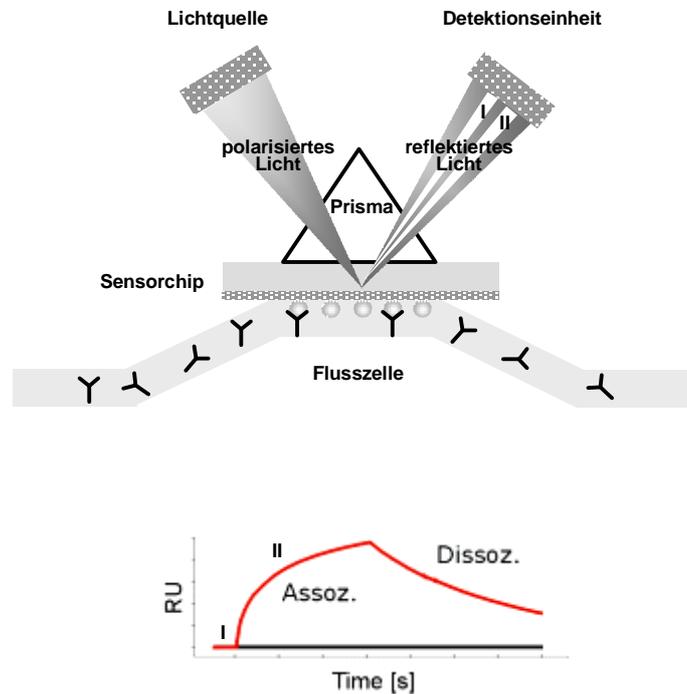


Abbildung 10: Das SPR-Messprinzip. Durch die Bindung von Analyten an den immobilisierten Liganden ändert sich der Brechungsindex in der Flusszelle, Dadurch ändert sich der Winkel, in dem der Intensitätsabfall des reflektierten Lichts verursacht durch SPR auftritt. Dieser wird von der optischen Detektionseinheit gemessen und als Messkurve dargestellt. RU: Resonance Units.

Das Messprinzip der SPR basiert auf der optischen Detektion einer elektromagnetischen Feldkomponente, der so genannten evaneszenten Welle. Diese entsteht, wenn Licht im Winkel der totalen internen Reflexion auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, hier eine Glasoberfläche und die Lösung in der Messzelle, trifft. Die SPR entsteht an dem Goldfilm des Sensor-Chips, indem das polarisierte, monochromatische Licht die Oberflächenelektronen des Goldes in Schwingung versetzt. Diese Energieaufnahme führt bei dem reflektierten Licht zu einem Intensitätsabfall bei einem definierten Winkel, der linear abhängig ist vom Brechungsindex und damit von der Konzentration gebundener Proteine auf der Chip-Oberfläche. Somit ändert sich durch die Bindung von Analyten an den immobilisierten Liganden der Brechungsindex in der Flusszelle und in Folge dessen aufgrund von auftretender SPR der Austrittswinkel des reflektierten Lichts. Die Winkeländerung dieses Intensitätsabfalls des reflektierenden Lichts kann durch einen Diodenarray Detektor gemessen werden und wird während der Analyse als Resonanzsignal in einer Messkurve

dargestellt (Abb. 10). Die Änderung des SPR-Signals wird in Resonance Units (RU) angegeben. Tausend RU entsprechen hierbei einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm².

Zur Bestimmung der Affinitäten verschiedener Anti-hNKG2D Antikörper wurde rek. humanes NKG2D/Fc (R&D Systems) auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Die Dextran-Oberfläche des Chips wurde durch Injektion von 35 µl 0,1 M Natrium-Hydroxysuccimid / 0,4 M N-ethyl-N'(3-dimethylaminpropyl)-carbodiimid (NHS/EDC) aktiviert. Zur Koppelung wurde das hNKG2D/Fc-Antigen auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml in 10 mM Natriumacetat (pH 4) verdünnt und in die Flusszelle injiziert. Die aktivierte Chip-Oberfläche wurde nachfolgend durch Injektion von 35 µl 1 M Ethanolamin-HCl (pH 8,5) blockiert. Von den unterschiedlichen Anti-hNKG2D Antikörpern wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe (sechs Verdünnungsstufen beginnend von 50 µg/ml-1,6 µg/ml, oder 5 µg/ml-156,3 ng/ml) in HBS-EP hergestellt. Anschließend wurden zur Messung der Assoziation 60 µl jeder Antikörperverdünnung über einen Zeitraum von 3 min in die Flusszelle injiziert, mit HBS-EP gewaschen und die Dissoziation für 5 min bei 25°C beobachtet wurde. Die Flussgeschwindigkeit betrug 20 µl/min mit HBS-EP als Laufpuffer. Die unspezifische Hintergrundabsorption von Protein auf einer unmodifizierten Flusszelle ohne hNKG2D/Fc wurde vom Antwortsignal auf der Flusszelle mit immobilisierten hNKG2D/Fc abgezogen. Die Regeneration des CM5-Sensorchips wurde mit einer 100 mM Glycin/500 mM NaCl-Lösung bei pH 3,0 für 45 sec. durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte manuell mit Hilfe der BIAevaluation Software (Biacore).

3.11.2 Durchflusszytometrie

3.11.2.1 Untersuchung der Expressionseigenschaften von Zelllinien

A. Färbung von Oberflächenmarkern

Vor der Verwendung bestimmter Zelllinien in einem Experiment wurden diese auf die Expression typischer Oberflächenmoleküle am FACS getestet. Hierzu wurden pro Färbung 2×10^5 Zellen einer bestimmten Zelllinie (P815, NKL, BaF/3-MICA, -ULBP-2) in eine 96-Well Rundboden-Platte überführt und mit 200 µl FACS-Puffer (1x PBS/2% h.i. FCS) gewaschen (1400 rpm, 3 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis mit 100 µl folgender Antikörper-Lösungen (5 µg/ml in FACS-Puffer) inkubiert.

Primäre Antikörper:

Anti-human MICA/B (mIgG2a; R&D-Systems)
Anti-human ULBP-2 (mIgG2a; R&D Systems)
Anti-human ULBP-1 (mIgG2a; R&D Systems)
Anti-human ULBP-3 (mIgG2a; R&D Systems)
Maus IgG2a, κ Isotyp-Kontrolle

PE-konjugierter Anti-human NKG2D (1D11) (mIgG1, Becton Dickinson)
PE-konjugierter Maus IgG1 κ -Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson)

Ratte Anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Receptor) (rIgG2b κ , Becton Dickinson)
Ratte IgG2b κ -Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson)

Nach zweimaligem Waschen mit 200 μ l FACS-Puffer wurden die Zellen zur Detektion des Primär-Antikörpers für 30 min bei 4°C mit 100 μ l eines entsprechenden Sekundär-Antikörpers inkubiert.

Sekundäre Antikörper: (1:100 in FACS-Puffer)

PE- oder FITC-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG, Fc γ -Fragment spezifisch;
(Jackson/Dianova)

FITC-konjugierter Ziege Anti-Ratte IgG, Fc γ -Fragment spezifisch; (Jackson/Dianova)

Die Zellen wurden zweimal mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die immunfluoreszenz-gefärbten Zellen konnten danach am FACS analysiert werden.

B. Intrazelluläre Färbung

Zur Untersuchung der Vitalität von NKL-Zellen wurde hier zusätzlich intrazelluläres Perforin und Granzym B gefärbt. Außerdem musste das Adaptermolekül des NKG2D-Rezeptors, DAP10, über eine intrazelluläre FACS-Färbung nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst die Fc-Rezeptoren auf den NKL-Zellen für 10-15 min bei 4°C mit 1x PBS/10% Humanserum AB (PAA) abgesättigt, um eine unspezifische Färbung mit den Antikörpern zu vermeiden. Anschließend wurden sie zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann mit 100 μ l einer Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung aus dem Cytofix/Cytoperm Fixierungs/Permeabilisierungs Kit (Becton Dickinson) für 20 min bei 4°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 250 μ l 1x Perm/Wash-Puffer (Becton Dickinson) wurden die NKL-Zellen mit 100 μ l einer 1:100 in 1x Perm/Wash-Puffer verdünnten Antikörper-Lösung für 30 min bei RT gefärbt.

Es wurden dabei folgende Antikörper und deren Isotyp-Kontrollen verwendet:

Maus Anti-human Perforin (mIgG2b, Becton Dickinson)

Maus Anti-human Granzym B (mIgG1, Serotec)

Ziege Anti-human DAP10 (Santa Cruz)

Nach der Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurden die Zellen zweimal mit 250 µl 1x Perm/Wash-Puffer gewaschen und danach in gleicher Weise mit den Sekundär-Antikörpern (PE-konjugierter Ziege Anti-Maus (Jackson/Dianova); FITC-konjugierter Kaninchen Anti-Ziege (Jackson/Dianova) versetzt und inkubiert (1:100 in 1x Perm/Wash-Puffer). Schließlich wurden die Zellen noch zweimal mit 1x Perm/Wash-Puffer gewaschen und für die Messung am FACS-Gerät in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.11.2.2 Test der biologischen Aktivität von aufgereinigtem His₆solhNKG2D-PEGbio

Um die biologische Bindungsaktivität des PEG-biotinylierten His₆solhNKG2D-Proteins zu testen, wurden pro Färbung 2×10^5 Zellen der BaF/3-Transfektanten (BaF/3-Vektor, BaF/3-hMICA und BaF/3-hULBP-2) in eine 96-Well Platte überführt. Die Zellen wurden für 30 min mit 10 µg/ml des aufgereinigten His₆solhNKG2D-PEGbio-Proteins auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Für die Detektion des gebundenen PEG-biotinylierten His₆solhNKG2D-Proteins wurde ein PE-konjugiertes Streptavidin (Dianova) 1:100 in FACS-Puffer verwendet. Nach zwei Waschgängen mit 200 µl FACS-Puffer wurden die Zellen schließlich für die Messung am FACS-Gerät in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Spezifität der Färbung wurde zum einen durch die Verwendung von BaF/3-Vektor-Zellen, welche keinen NKG2D-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, und zum anderen durch die alleinige Verwendung von PE-Streptavidin auf BaF/3-hMICA- bzw. BaF/3-hULBP-2-Zellen gewährleistet.

3.11.2.3 Überprüfung des Reinheitsgrades isolierter humaner NK-Zellen

Zur Kontrolle der Reinheit von aus PBMCs isolierten humanen NK-Zellen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen, sowohl PBMCs als auch aufgereinigte NK-Zellen, mit den nachfolgenden Antikörpern gefärbt. Die Antikörper von Becton Dickinson wurden mit je 20 µl/ 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer eingesetzt. Die Durchführung der Färbung war ansonsten identisch zum Protokoll aus 3.11.2.1/A.

PE-konjugierte Maus IgG1 κ -Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson)
 PE-konjugierte Maus IgG2a-Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson)
 Cytochrom-konjugierte Maus IgG1 κ -Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson)
 PE-konjugierte Anti-human CD3 (Becton Dickinson, mlgG2a κ)
 PE-konjugierte Anti-human CD56 (Becton Dickinson, mlgG1 κ)
 Cytochrom-konjugierter Anti-human CD16 (Becton Dickinson, mlgG1 κ)
 PE-konjugierter Anti-human NKG2D (1D11) (Becton Dickinson, mlgG1 κ)
 PE-konjugierter Anti-human CD14 (Becton Dickinson, mlgG1 κ)
 PE-konjugierter Anti-human HLA-DR (Becton Dickinson, mlgG2a)

Bei stimulierten humanen NK-Zellen wurde außerdem eine Färbung des Oberflächenproteins CRTAM durchgeführt. Hierzu wurde ein Anti-human CRTAM Antikörper (mlgG2b κ , R&D Systems) auf 25 μ g/ml in FACS-Puffer eingestellt und davon 10 μ l auf 200 μ l Zellsuspension gegeben. Die Detektion der Maus IgG2b-Isotyp-Kontrolle und des Anti-human CRTAM Antikörpers erfolgte über einen PE-konjugierten Ziege Anti-Maus Antikörper (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer). Neben CRTAM wurden auch die Oberflächenproteine CD160 (BY55), CD178 (Fas-Ligand) und TNFS14 (LIGHT) nach Stimulation auf NK-Zellen gemessen.

3.11.2.4 Messung von TNF α , IFN γ und IL-8 im Zellkulturüberstand stimulierter NK-Zellen

Zur Messung der Zytokine TNF α und IFN γ im Zellkulturüberstand unterschiedlich stimulierter humaner NK-Zellen wurde ein human-spezifischer Th1/Th2 Zytokinkit II (Becton Dickinson) verwendet.

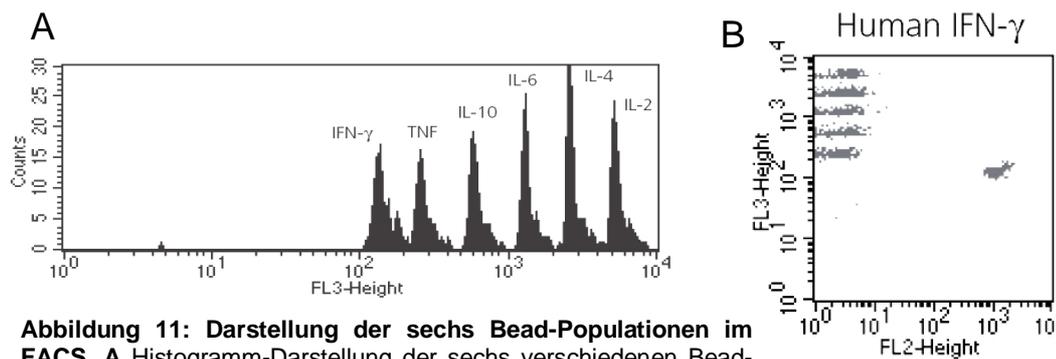


Abbildung 11: Darstellung der sechs Bead-Populationen im FACS. A Histogramm-Darstellung der sechs verschiedenen Bead-Populationen mit unterschiedlich starker FL-3 Intensität. **B** Dotplot-Darstellung einer Detektion von humanem IFN γ mit Hilfe des CBA.

Die Cytometric Bead Array (CBA)-Methode basiert auf sechs Bead-Populationen, die alle eine unterschiedliche FL-3 Intensität am FACS aufweisen. Jede dieser Bead-Populationen ist mit einem bestimmten Antikörper gekoppelt, der spezifisch ist für humanes IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α oder IFN γ . Die mit Anti-IL-2 Antikörpern konjugierten Beads besitzen hierbei die stärkste, die mit Anti-IFN γ Antikörpern konjugierten Beads die schwächste FL-3 Intensität am FACS (s. Abb. 11A).

An diese mit Antikörper-bedeckten Beads können die Zytokine im Zellkulturüberstand binden. Die gebundenen Zytokine können anschließend über einen PE-konjugierten Zweit-Antikörper (FL-2), der ebenfalls gegen eines der Zytokine gerichtet ist, detektiert werden (s. Abb. 11B). Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde für die Verwendung kleinerer Volumina in einer 96-Well Spitzboden-Platte durchgeführt. Für die Messung von humanem IL-8 im Zellkulturüberstand wurde ein CBA Human Inflammation Kit (Becton Dickinson) und für die Detektion von humanem IL-3 wurde ein CBA Human Allergy Mediators Kit (Becton Dickinson) verwendet. Die Vorgehensweise wird in den folgenden Abschnitten A-C geschildert:

A. Herstellung des humanen Th1/Th2 Zytokin-Standards

Zur Herstellung einer 10x Stocklösung eines Th1/Th2-Zytokinstandards wurde ein Glasgefäß mit lyophilisiertem Standard (Becton Dickinson) in 200 µl Assay Diluent (Becton Dickinson) vorsichtig durch leichtes Schwenken aufgelöst und für 15 min bei RT inkubiert. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden 900 µl in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 100 µl der 10x Stocklösung zugegeben (Top Standard). In weitere neun Gefäße wurden je 300 µl Assay Diluent vorgelegt und 300 µl des Top Standards in das nächste Gefäß übertragen. Aus diesem Gefäß wurden nach kurzem Mischen wieder 300 µl entnommen und in das nächste Gefäß überführt, solange bis die 1:2-Verdünnungsreihe (Top-Standard: 5000 pg/ml – 2500 pg/ml – 1250 pg/ml – 625 pg/ml – 312,5 pg/ml – 156 pg/ml – 78 pg/ml – 39 pg/ml – 20 pg/ml - Leerwert) fertig erstellt war.

B. Herstellung des Capture-Beads-Mix

Pro Probe wurden je 5 µl von jeder der sechs „Bead“-Lösungen (Becton Dickinson) nach sorgfältigem Vortexen in einem geeigneten Reaktionsgefäß zusammen pipettiert und gut durchmischt (z.B. für 100 Proben wurden je 500 µl einer Beadlösung benötigt).

C. Ansetzen des CBA und Färbung der Instrument Setup Beads

In einer 96 well Spitzboden-Platte wurden jeweils 25 µl des Bead-Mixes auf die Wells verteilt. Anschließend wurden 25 µl der Standardverdünnungen oder 25 µl der Proben hinzu gegeben. Im letzten Schritt wurden noch 25 µl des humanen Th1/Th2 Zytokin Kit II PE-Detektionsreagenz (Becton Dickinson) dazu pipettiert. Der Ansatz wurde für 2-3 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden auf jedes Well 100 µl Waschpuffer (Becton Dickinson) gegeben und die Platte bei 300 g für 4 min bei RT

zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet in 200 µl Waschpuffer resuspendiert und die Proben in FACS-Röhrchen überführt.

Etwa 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden in drei FACS-Röhrchen jeweils 50 µl der Zytometer Setup Beads (Becton Dickinson) pipettiert. In einem Röhrchen A waren nur Beads, in ein Röhrchen B wurden 50 µl der FITC-Positiv Kontroll-Lösung (Becton Dickinson), in ein Röhrchen C wurden 50 µl der PE-Positiv Kontroll-Lösung (Becton Dickinson) zugegeben. Alle drei Röhrchen wurden für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden in das Röhrchen A 450 µl Waschpuffer und in die beiden anderen je 400 µl Waschpuffer gegeben. Mit Hilfe dieser gefärbten Setup-Beads und dem CBA Instrument Setup Template (Becton Dickinson) wurden anschließend die Voreinstellungen bzw. Instrument Settings am FACS-Gerät vorgenommen. Die Messung der Zytokin-Beads erfolgte über die CellQuest Pro Software. Für die Auswertung wurde eine spezielle CBA Software verwendet.

3.11.2.5 Untersuchung der Kreuzreaktivität von Anti-hNKG2D Antikörpern

Um einen späteren Einsatz der Anti-hNKG2D Antikörper in einem relevanten Tiermodell zu rechtfertigen, wurden deren Bindungseigenschaften auf unterschiedlichen NKG2D-Spezies mittels FACS untersucht. Hierzu wurden pro FACS-Färbung 2×10^5 CHO-NKG2D⁺/DAP10⁺-Transfektanten der Spezies *H. sapiens*, *M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus* und *M. musculus* verwendet, deren Herstellung im Abschnitt 3.6.2 beschrieben wurde. Diese wurden in eine 96-Well Rundboden-Platte überführt und bei 1400 rpm und 4°C für 3 min abzentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig abgekippt und die Zellpellets in 200 µl FACS-Puffer (1x PBS/2% h.i. FCS) resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Antikörpern (5 µg/ml in 200 µl FACS-Puffer) für 30 min bei 4°C inkubiert. Hierbei wurde für die Detektion von His₆-markiertem NKG2D ein Anti-PentaHis Antikörper (Qiagen) und für den Nachweis von FLAG-markiertem DAP10 ein Anti-FLAG Antikörper (Sigma) mit ihren entsprechenden Isotyp-Kontrollen eingesetzt. Diese Färbungen dienten vor allem einer Überprüfung der optimalen Expression von NKG2D und DAP10 an der Membranoberfläche der CHO-Zellen. Außerdem wurden die Spezifitäten der jeweiligen Antikörper durch zusätzliche Färbungen auf untransfizierten CHO-Zellen kontrolliert. Zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten wurden die verschiedenen CHO-NKG2D⁺/DAP10⁺-Transfektanten mit unterschiedlichen Anti-hNKG2D-Antikörpern ebenfalls für 30 min bei 4°C inkubiert. Hierzu wurden folgende Antikörper und deren Isotyp-Kontrollen in einer Konzentration von 5 µg/ml in 200 µl FACS-Puffer eingesetzt: muriner 6H7 Anti-hNKG2D Antikörper (mIgG1, Micromet AG), humaner E1VLV71KVH Anti-hNKG2D Antikörper (hIgG1, Micromet AG),

humaner B1VLB6VH Anti-hNKG2D Antikörper (hIgG1, Micromet AG) und humaner E4VLG10VH Anti-hNKG2D Antikörper. Nach zwei Waschgängen mit je 200 µl FACS-Puffer wurden die Zellen mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern, PE-konjugierter Ziege Anti-human IgG (Jackson/Dianova; 1:100 in FACS-Puffer) oder Ziege Anti-Maus IgG (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer) für 30 min bei 4°C im Dunkeln behandelt, danach zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und die immunfluoreszenzgefärbten Zellen schließlich für die Analyse am FACS-Gerät in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.11.2.6 Untersuchung der Thermostabilität von Anti-hNKG2D Antikörpern

Verschiedene Anti-hNKG2D Antikörper (humaner E1VLV71KVH, humaner B1VLB6VH und humaner E4VLG10VH) wurden zur Überprüfung ihrer Thermostabilität auf eine Konzentration von 1 µg/ml in 1x PBS/1% h.i. FCS/0,05% Natriumazid eingestellt und 200 µl der Antikörper-Lösungen zu je 100 µl auf Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben wurden nun im Wasserbad für 5 min bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C und 50-100°C in 10°C-Schritten) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße direkt auf Eis abgekühlt. Für die anschließende Untersuchung der Stabilität der Antikörper bei den unterschiedlichen Temperaturen wurde deren Bindungsaktivität auf NKG2D-exprimierenden Zellen (NKL) im FACS getestet. Hierzu wurden pro Färbeansatz 2×10^5 NKL in 96-Well Rundbodenplatten überführt, zweimal mit FACS-Puffer (1x PBS/1% h.i. FCS/0,05% Natriumazid) gewaschen und die Zellen anschließend mit 30 µl der bei unterschiedlichen Temperaturen behandelten Antikörper-Lösungen (1 µg/ml) (pro Antikörper und Temperatur jeweils vier Replikate) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen zur Detektion der gebundenen Anti-hNKG2D-Antikörper mit einem PE-konjugierten Ziege Anti-human Antikörper (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer) für 30 min bei 4°C im Dunkeln behandelt. Für die Analyse der Bindungsaktivitäten der Antikörper mittels FACS wurden die Zellen nach zwei Waschgängen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

3.11.2.7 Untersuchung der Serumstabilität von Anti-hNKG2D Antikörpern

Die humanen Anti-hNKG2D Antikörper wurden in PBS auf eine Konzentration von 60 µg/ml eingestellt und nachfolgend mit dem gleichen Volumen an humanem AB-Serum (PAA) verdünnt. Diese Lösung wurde auf verschiedene Reaktionsgefäße verteilt und entweder sofort schockgefroren und bei -80°C gelagert oder zunächst für 1, 2, 4 oder 7 Tage bei 37°C inkubiert. Alle Proben wurden gleichzeitig wieder aufgetaut und die

Bindungsaktivität der Antikörper in Form einer Titrationskurve auf NKG2D-positiven NKL-Zellen am FACS untersucht. Hierzu wurden pro Antikörper und Verdünnungsstufe 2×10^5 NKL-Zellen eingesetzt. Von den im Serum befindlichen Antikörpern wurde eine 1:3-Verdünnung (Anfangskonzentration: $10 \mu\text{g/ml}$) erstellt, je $100 \mu\text{l}$ der Antikörperverdünnungen in Duplikaten auf die zuvor mit FACS-Puffer gewaschenen Zellen pipettiert und diese für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Detektion der gebundenen Anti-hNKG2D Antikörper erfolgte über einen PE-konjugierten Ziege Anti-human Antikörper (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer) für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Für die Analyse der Serumstabilität der Antikörper am FACS-Gerät wurden die Zellen nach zwei Waschgängen in $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

3.11.2.8 Untersuchung der Bindungsaktivität von Anti-hNKG2D-Antikörpern oder-scFv im FACS

Pro Ansatz wurden hierzu 2×10^5 NKL-Zellen in eine 96-Well Rundboden-Platte überführt und mit $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis mit $90 \mu\text{l}$ verschiedener Anti-human NKG2D-Antikörper bzw. -scFv in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Von den jeweiligen Antikörpern wurde hierzu in einer Master-Platte eine 1:3-Verdünnungsreihe in FACS-Puffer (Anfangs-Konz.: $10 \mu\text{g/ml}$) erstellt. Von den über Ni-NTA aufgereinigten Anti-human NKG2D-scFv (s. 3.5.3) wurde ebenfalls eine 1:3-Verdünnungsreihe hergestellt, allerdings waren die Konzentrationen hier unbekannt. Die relative Menge an eingesetztem scFv wurde zuvor über ein Proteingel bestimmt (s. 3.5.3). Nach zweimal Waschen mit $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer wurden die Zellen anschließend für 30 min auf Eis mit einem PE-konjugierten Ziege Anti-Maus IgG oder einem PE-konjugierten Ziege Anti-human IgG (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer) inkubiert (je $30 \mu\text{l/Well}$). Nach der Inkubation wurde wiederum zweimal mit $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 4°C und 1400 rpm für 3 min) und die Zellen schließlich in $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden direkt am FACS-Gerät analysiert.

3.11.2.9 Untersuchung der Konkurrenz der ULBP-2Fc-Bindung an CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Zellen durch Anti-hNKG2D-Antikörper oder -scFv

Die Fähigkeit der Anti-hNKG2D-Antikörper bzw. -scFv, die Interaktion eines Liganden mit dem NKG2D-Rezeptor zu unterbinden, wurde mit Hilfe eines Wettbewerbs-Experiments am FACS untersucht. Hierzu wurden pro Probe 2×10^5 NKG2D-exprimierende Zellen (NKL oder CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Transfektanten) verwendet. Zur Analyse des maximalen Bindungssignals des NKG2D-Liganden an die Zelloberfläche wurde $1 \mu\text{g}$

ULBP-2Fc-Protein oder ULBP-2FcPEGbio (3,9 ng bei Untersuchung von Anti-hNKG2D scFv) für 30 min bei 4°C mit den Zellen inkubiert und die Bindung anschließend für 30 min bei 4°C über den humanen Fc-Teil des Fusionsproteins durch die Zugabe eines FITC-konjugierten Ziege Anti-human-Antikörpers (Jackson/Dianova, 1:100 in FACS-Puffer) detektiert. Die Detektion der Bindung von PEG-biotinyliertem ULBP-2Fc erfolgte über Streptavidin-PE. Als Kontrolle für die spezifische Bindung des ULBP-2Fc wurde die Färbung auch mit einem CD25/Fc bzw. CD25Fc-PEGbio-Protein durchgeführt. Im Kompetitions-Experiment wurden die Zellen vor Zugabe des Liganden für 30 min bei 4°C mit einem Anti-hNKG2D-Antikörper (5 µg/ml in FACS-Puffer) bzw. mit 50 µl scFv-Lyseextrakt (s. 3.4.7.1) oder den entsprechenden Isotyp-Kontrollen inkubiert. Das ULBP-2/Fc wurde anschließend direkt zu den mit Antikörpern inkubierten Zellen zupipettiert. Auch hier wurde die durch die Antikörper reduzierte Bindung des ULBP-2Fc über den humanen Fc-Teil oder PEG-Biotinylierung des Fusionsproteins nachgewiesen.

3.11.3 *In vitro*-Funktionalitätsstudien der Anti-hNKG2D Antikörper

Zur Analyse der physiologischen Funktionalität der Anti-hNKG2D Antikörper *in vitro* wurden Studien mit Hilfe von mit radioaktivem ^{51}Cr beladenen Zielzellen durchgeführt, sogenannte ^{51}Cr -Freisetzungs-Experimente. Anhand der Ergebnisse aus diesen Versuchen konnten sowohl Aussagen über die Aktivierungs- als auch die Inhibierungseigenschaften (Redirected Lysis- bzw. normales ^{51}Cr -Freisetzungs-Experiment) der Anti-human NKG2D Antikörper getroffen werden.

3.11.3.1 Untersuchung der Blockeffizienz von Anti-hNKG2D Antikörpern im radioaktiven ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay

Um die Blockeffizienz der NKG2D-Rezeptor-vermittelten Zielzell-Lyse zu untersuchen, wurden zunächst je $1,2 \times 10^6$ Zielzellen (3000 Zellen/Probe), d.h. NKG2D-Liganden tragende Zelllinien (BaF/3-MICA- und BaF/3-ULBP-2-Zellen) und eine Kontroll-Zelllinie (BaF/3-Vektor), in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt und für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde hinter einer Bleiburg direkt in $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Hartmann Analytics), in der Regel 50 µl einer ^{51}Cr -Lösung, resuspendiert und für 1 h in einem Bleibehälter bei 37°C und 7% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnten die Effektorzellen, d.h. die NKG2D exprimierende Zelllinie NKL, und die Antikörper-Verdünnungen für den Versuch vorbereitet werden. Es wurde eine für die in Triplikaten durchgeführten Versuchsansätze ausreichende Menge an NKL aus der Zellkultur entnommen und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Bei einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 40:1 wurden pro Probe $1,2 \times 10^5$ NKL-Zellen benötigt. Das Zellpellet wurde anschließend mit NKL-Medium* (RPMI/10% h.i. FCS/200 U/ml rek.

humanes IL-2) auf eine Zellkonzentration von $1,2 \times 10^5$ NKL pro 100 μ l Medium eingestellt. Die Verdünnungen der Antikörper wurden in Triplikaten mit NKL-Medium* in 96-Well Rundboden-Platten angesetzt. Hierzu wurden in die ersten Wells 150 μ l bzw. 125 μ l einer Antikörper-Lösung (Isotyp-Kontrollen bzw. Anti-human NKG2D Antikörper) mit z.T. unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen pipettiert, in die folgenden Wells wurden jeweils 100 μ l NKL-Medium* vorgelegt und nach gutem Mischen immer 50 μ l bzw. 25 μ l vom ersten Well ab in die folgenden Wells übertragen (1:3- bzw. 1:5-Verdünnungen). Für jeden Versuchsansatz (Triplikate und 2-3 verschiedene Zielzellen) wurden schließlich je 100 μ l der NKL-Zellsuspension zu 100 μ l Antikörper-Verdünnung oder 100 μ l vorgelegtem NKL-Medium* (Positiv-Kontrolle) gegeben. Die NKL wurden für ca. 30 min mit den Antikörpern bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank vorinkubiert.

Die mit radioaktivem ⁵¹Cr beladenen Zielzellen wurden nun dreimal mit je 5 ml NKL-Medium* gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4°C) und auf eine Konzentration von 6×10^4 Zellen pro ml NKL-Medium* eingestellt. Dazu wurden bei einem geschätzten Verlust von 20% der ursprünglich eingesetzten Anzahl an Zielzellen ($1,2 \times 10^6$) 1×10^6 Zellen in 10 ml NKL-Medium* resuspendiert (1×10^5 Zellen/ml) und diese Zellsuspension anschließend nochmals 3:2 verdünnt (6×10^4 Zellen/ml). 50 μ l der Ziel-Zellsuspension (3000 Zellen) wurden letztlich zu allen Proben dazu pipettiert (Gesamtvolumen: 250 μ l), unter anderem zu 200 μ l NKL-Medium* ohne NKL-Zellen (minimale ⁵¹Cr-Freisetzung bzw. Hintergrund-Kontrolle) und 200 μ l 1% TritonX (maximale ⁵¹Cr-Freisetzung durch Lyse der Zellen). Das fertig angesetzte Experiment wurde für 4 h bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μ l des Zellkulturüberstandes vorsichtig vom Plattenrand in die entsprechende Gammazähler-Röhrchen überführt und diese dann zur Messung des im Medium freigesetzten ⁵¹Cr in den Gammazähler einsortiert. Für die Auswertung der Daten und zur Berechnung der spezifischen Zielzell-Lyse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{\text{Mittelwert (cpm)} - \text{Mittelwert min. Freisetzung (cpm)}}{\text{Mittelwert max. Freisetzung (cpm)} - \text{Mittelwert min. Freisetzung (cpm)}} \times 100$$

min. Freisetzung: Zielzellen ohne Effektorzellen

max. Freisetzung: Zielzellen in 1% TritonX-Lösung

10% TritonX-Lösung:

5 ml TritonX-100 wurden in 45 ml Aqua dest. über Nacht bei RT gelöst.

Für die Versuche wurde die Lösung zuvor 1:10 verdünnt.

3.11.3.2 Untersuchung der Induktionseigenschaften der Anti-hNKG2D Antikörper im Redirected Lysis-Experiment

Die Fähigkeit der Anti-hNKG2D Antikörper, eine NKG2D-Rezeptor abhängige Zielzell-Lyse zu induzieren, wurde mit Hilfe eines Redirected Lysis-Experiments untersucht. Hierzu wurde eine Fc-Rezeptor positive P815-Zelllinie mit radioaktivem ^{51}Cr beladen und anschließend mit NKL-Effektorzellen in Anwesenheit von Anti-hNKG2D Antikörpern im Verhältnis 1:40 für 6 h bei 37°C im Brutschrank kokultiviert. Die Durchführung des Versuches war ansonsten identisch zum normalen ^{51}Cr -Freisetzungs-Experiment (s. 3.11.3.1).

3.11.4 ELISA

3.11.4.1 Streptavidin-PEGbio NKG2D ELISA

Die Bindungsaktivität schrittweise humanisierter Anti-hNKG2D scFv wurde auf löslichem PEGbiotinyliertem hNKG2D (hNKG2D-PEGbio, s. 3.8) mittels ELISA untersucht. Hierzu wurden zunächst periplasmatische Aufschlüsse (s. 3.4.7.1) einzelner mutierter Klone (s. 3.4.7.3) produziert und eine Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte (Nunc) über Nacht mit 100 μl (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) einer hNKG2D-PEGbio-Lösung immobilisiert. Die ELISA-Platte wurde dreimal mit einem ELISA-Waschgerät mit 200 μl PBS-T (1x PBS/0,05% Tween 20) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 100 μl PBS-T/4% BSA für eine Stunde bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Platte wieder dreimal mit PBS-T gewaschen. Von den periplasmatischen Extrakten wurden in einer Masterplatte 1:3-Verdünnungen in PBS-TB (1x PBS/0,05% Tween 20/1% BSA) erstellt und davon je 100 μl im ELISA eingesetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei RT wurde wiederum dreimal mit 200 μl PBS-T gewaschen. Die Detektion der an das NKG2D gebundenen His₆-markierten scFv erfolgte über einen HRP-konjugierten Anti-His Antikörper (Roche, 1:500 in PBS-TB). Pro Probe wurden je 100 μl des Antikörpers zupipettiert und für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBS-T wurden je 100 μl einer ABTS-Substratlösung (Roche) zugegeben und nach ausreichender Farbentwicklung die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

3.11.4.2 Human GM-CSF ELISA

Für die Messung von humanem GM-CSF im Zellkulturüberstand nach Stimulation humaner NK-Zellen mit NKG2D-Liganden (s. 3.10.5 und 3.10.6) wurde ein human GM-CSF ELISA Set (Becton Dickinson) verwendet. Die ELISA-Platten wurden zunächst bei 4°C über Nacht mit 100 μl Capture-Antikörper (Becton Dickinson, 1:250 in

Immobilisierungs-Puffer: 0,1 M Natrium Carbonat, pH 9) inkubiert. Nach drei Waschgängen mit 300 µl PBS-T wurde die Platte mit 200 µl 1x PBS/10% FCS für 1 h bei RT abgeblockt und anschließend wieder dreimal gewaschen. In einer Masterplatte wurden von einem human GM-CSF-Standard (Becton Dickinson) und von den Zellkulturüberständen mit 1x PBS/10% FCS entsprechende Verdünnungen hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungen des Standards (1:2-Verdünnung, Anfangskonzentration: 400 pg/ml) bzw. der Probe wurden in Duplikaten je 100 µl auf die Platte pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T wurden je 100 µl eines Reaktionsgemisches aus biotinyliertem Detektions-Antikörper und Streptavidin-HRP (Becton Dickinson, beide 1:250 in 1x PBS/10% FCS) zugegeben. Schließlich wurde nach 1 h Inkubation bei RT sieben Mal gewaschen und pro Kammer 100 µl OPD-Substratlösung (Sigma) zupipettiert. Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 30 min) wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) bestimmt. Die Konzentration an humanem GM-CSF in den einzelnen Überständen wurde anhand des Standards ermittelt.

3.11.4.3 Human CCL3/CCL4/Fas-Ligand/XCL1 ELISA

Zum Nachweis von humanem CCL4 (MIP-1β), humanem CCL3 (MIP-1α), humanem Fas-Ligand und humanem XCL1 im Zellkulturüberstand nach Stimulation humaner NK-Zellen mit NKG2D-Liganden (s. 3.10.5 und 3.10.6) wurde ein entsprechendes humanes ELISA-Set (DuoSet®, R&D Systems) verwendet. Hierzu wurden ELISA-Platten mit 100 µl Maus Anti-human CCL3/CCL4/Fas-Ligand/XCL1 Antikörper (1 µg/ml bzw. 2 µg/ml für XCL1 in PBS) bei 4°C über Nacht immobilisiert und nach dem Waschen mit PBS-T die unspezifischen Bindungsstellen mit 300 µl PBS-TB (1x PBS/0,05% Tween 20/1% BSA) abgesättigt (1 h bei RT). Von den entsprechenden Standards (R&D Systems, Anfangskonzentration: CCL3/CCL4: 1000 pg/ml; Fas-Ligand: 2000 pg/ml; XCL1: 4000 pg/ml) und den Zellkulturüberständen wurden in einer Masterplatte 1:2-Verdünnungen in PBS-TB erstellt (Duplikate) und davon nach dem Waschen der Platten je 100 µl im ELISA eingesetzt. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT wurde wiederum dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl eines biotinylierten Ziege Anti-human CCL3/CCL4/Fas-Ligand/XCL-1 Antikörpers (R&D Systems) (50 ng/ml oder für XCL1 200 ng/ml in PBS-TB) zupipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte über die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP (1:200 in PBS-TB) für 20 min bei RT und anschließender Inkubation mit 100 µl OPD-Substratlösung (Sigma). Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 30 min) wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die

Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) bestimmt. Die Konzentration an humanem CCL3, CCL4, Fas-Ligand oder XCL1 in den einzelnen Überständen wurde anhand der Standards ermittelt.

3.11.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

3.11.5.1 Konjugation von Antikörpern mit Alexa Fluor 488

Für die Untersuchung einer Internalisierung der Anti-hNKG2D Antikörper nach Bindung an das Antigen im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mussten zuvor zwei der affinitätsmaturierten humanen Anti-hNKG2D-Antikörper und eine entsprechende Isotyp-Kontrolle mit einem für das CLSM geeigneten Farbstoff konjugiert werden. Die Vorgehensweise hierbei wird in den folgenden Abschnitten A-E geschildert:

A. Dialyse gegen Borat-Puffer

Die zu konjugierenden Antikörper mussten zunächst gegen Borat-Puffer dialysiert werden. Zur Dialyse wurden Dialyseschläuche (Dialysis Tubing) von Sigma (D-0405-100FT) verwendet. Die Dialyseschläuche wurden vorher mit Wasser ausgekocht. Anschließend wurde das restliche Wasser aus dem Schlauch ausgestrichen und der Schlauch am unteren Ende mit einer Klammer abgeklemmt. Am oberen Ende wurde dann das zu dialysierende Protein vorsichtig hinein pipettiert und die Lösung nach unten zur ersten Klammer hin gestrichen. Ein Stückchen oberhalb des Flüssigkeitsstandes wurde eine zweite Klammer angebracht. Das überhängende Schlauchende wurde nun an einer weiteren Klammer eingehakt, die man an einem Becherglas befestigen konnte und anschließend noch mit einer Wäscheklammer fixiert. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde nun in ein mit 1 L Boratpuffer gefülltes Becherglas eingesetzt. Das Becherglas wurde auf einen Magnetrührer gestellt und der Puffer alle 1-2 h gewechselt, so dass insgesamt fünf Dialysevorgänge (5 Liter Boratpuffer) stattfanden, der letzte über Nacht. Nach der Dialyse wurde der Schlauch unterhalb der zweiten Klammer abgeschnitten, möglichst ohne eine Kontamination mit Flüssigkeit von außen oder von der oberen Schlauchhälfte zu bekommen.

Boratpuffer: 0.05 M Borsäure (Sigma)
0.1 M NaCl (Merck)
pH 8.5

B. Lösen und Aliquotieren des Alexa Fluor 488 (Invitrogen; A20000)

Der als Pulverform gelieferte Alexa Fluor 488 Farbstoff (Invitrogen) wurde zunächst in einer für die nachfolgende Konjugation mit den Antikörpern (human IgG1 λ Isotyp, B1VLB6VH, E4VLG10VH) optimalen Menge an reinem DMSO gelöst und aliquotiert (s. Berechnung). Hierzu wurden 1 mg Alexa Fluor 488 Farbstoff ($1,56 \times 10^{-6}$ mol) in 388,8 μ l DMSO aufgenommen über Kopf geschüttelt, kurz abzentrifugiert und je 50 μ l des gelösten Farbstoffs in 500 μ l Mikroschraubröhrchen (Sarstedt) transferiert. Durch den Einsatz von 50 μ l Alexa 488-Lösung in DMSO konnte genau 1 mg Antikörper in 1 ml Volumen bei 30fachem Überschuß des Farbstoffs und 5% DMSO-Gehalt konjugiert werden. Bis zur Verwendung wurden die Farbstoff-Aliquots bei -20°C gelagert.

Berechnungen:

1 mg Alexa Fluor 488, MW 643 g/mol

$0,001 \text{ g} / 643 \text{ g/mol} = 1,56 \times 10^{-6} \text{ mol Farbstoff absolut}$

Annahme: Verwendung von 1 mg Antikörper (Ak) zur Konjugation

1 mg Ak, MW 150000 g/mol

$0,001 \text{ g} / 150000 \text{ g/mol} = 6,67 \times 10^{-9} \text{ mol Ak}$

30facher Überschuss an Farbstoff: $2 \times 10^{-7} \text{ mol Alexa 488 Farbstoff}$

Alexa Farbstoffe (absolut)/benötigte Farbstoffe = $1,56 \times 10^{-6} / 2 \times 10^{-7} = 7,78 \text{ Aliquots}$

Bei Konjugation müssen 5% DMSO anwesend sein:

1 mg/ml Ak \rightarrow 1 ml Volumen \rightarrow 50 μ l DMSO = 5%

$50 \mu\text{l} \times 7,78 = 388,8 \mu\text{l DMSO (sehr rein)}$

C. Konjugation der Anti-hNKG2D Antikörper und Isotyp-Kontrolle mit Alexa Fluor 488

Nach dem Dialysevorgang der Antikörper musste deren Konzentration in Borat-Puffer erneut photometrisch durch die Messung der OD bei 280 nm bestimmt werden. Ausgehend von den aktuellen Antikörperkonzentrationen wurde eine bestimmte Menge Antikörper mit einem 30-40fachen Überschuss an Alexa Fluor 488 bei 5% DMSO inkubiert. Der Alexa 488-Farbstoff wurde hierbei zuvor mit dem fehlenden DMSO in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und gut vermischt. Die Mischung wurde dann zum umgepufferten Antikörper unter Vortexen zugegeben, um Hotspots zu vermeiden. Anschließend wurde das Konjugationsgemisch für 1 h bei RT auf dem Dynalrad inkubiert.

D. Gelfiltration mit Sephadex G-25 Medium Säule

Die Sephadex G-25 Medium Säule wurde zunächst mit dem dreifachen Säulenvolumen (3x 15 ml = 45 ml) 1x PBS (steril, RT) equilibriert. Dann wurde nicht mehr als 1 ml des Konjugats auf die Säule gegeben und durch die Fritte ins Gel laufen gelassen. Anschließend wurden 500 µl 1x PBS daraufgegeben und ebenfalls ins Gel laufen gelassen. Durch weitere Zugabe von 1x PBS auf die Säule wurde der Durchlauf in einer 96-Well-Rundboden-Platte (weiß, NUNC) fraktioniert. Hierbei wurden zunächst je 5 Tropfen pro Well aufgefangen. Sobald das Konjugat im Durchlauf erkennbar war (leicht grünliche Tropfen), wurden je 4 Tropfen pro Well gesammelt. Die Fraktionierung wurde solange durchgeführt bis unkonjugierter Farbstoff die Säule passierte. Dann wurde die Säule wieder mit 45 ml PBS equilibriert und das nächste Konjugat zur Fraktionierung auf die Säule gegeben.

E. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach dem Konjugationsprozess wurde die Proteinkonzentration der Antikörper (OD bei 280 nm) unter Berücksichtigung des Alexa 488-Konjugats (OD bei 494 nm) erneut photometrisch bestimmt. Hierzu wurden nacheinander die OD-Werte bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280} , Antikörper) und bei einer Wellenlänge von 494 nm (A_{494} , Alexa 488) gemessen und die aktuelle Antikörperkonzentration mit Hilfe der Herstellerinformationen des Farbstoffs und folgenden Formeln berechnet.

Berechnung der Proteinkonzentration In mol:

$$\text{Proteinkonzentration } M = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0,11)] \times \text{Verdünnungsfaktor}}{2,03 \times 10^5}$$

$2,03 \times 10^5$ ist hierbei der molare Extinktionskoeffizient eines IgG-Antikörpers und 0,11 der Korrekturfaktor für die Absorption des Alexa-Farbstoffes bei 280 nm.

Berechnung des Konjugations-Grades:

$$\text{Mol des Farbstoffs pro mol Protein} = \frac{A_{494} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{7,1 \times 10^4 \times \text{Proteinkonzentration } (M)}$$

$7,1 \times 10^4$ ist hierbei der molare Extinktionskoeffizient des Alexa 488-Farbstoffes bei 494 nm.

Berechnung der Proteinkonzentration:

$$[c]_{mg/ml} = \frac{A_{280} - (A_{494} \times 0,11)}{1,4}$$

Die Alexa Fluor 488-Konjugation wurde am FACS auf NKG2D positiven NKL-Zellen überprüft.

3.11.5.2 Untersuchung der Internalisierung von Anti-hNKG2D Antikörpern

Für die Analyse einer Antikörper-Internalisierung durch NK-Zellen nach Bindung an den NKG2D-Rezeptor wurde eine Färbekinetik durchgeführt. Hierzu wurden pro Zeitpunkt und Antikörper je 6×10^5 NKL in einer 96-well Rundbodenplatte ausgesät und zweimal mit 1x PBS/2% h.i. FCS gewaschen (Zentrifugation 1400 rpm, 4°C, 3 min). Um eine unspezifische Färbung mit den Alexa Fluor 488-konjugierten Anti-human NKG2D Antikörpern (B1VLB6VH und E4VLG10VH) zu vermeiden, wurden zuvor die Fc-Rezeptoren auf den NKL-Zellen für 10-15 min bei 4°C mit 1x PBS/10% Human Serum AB (PAA) abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS/2% h.i. FCS erfolgte die Inkubation mit 5 µg/ml (in 200 µl 1x PBS/2% h.i. FCS) der Alexa 488-konjugierten Anti-hNKG2D Antikörper (B1VLB6VH und E4VLG10VH) bzw. der Alexa 488-konjugierten human IgG1λ-Isotyp-Kontrolle für 45 min auf Eis. Anschließend wurden die NKL-Zellen dreimal mit 1x PBS/2% h.i. FCS gewaschen. Bis auf den Inkubationszeitpunkt 0 min wurden alle anderen NKL-Zellen wieder in NKL-Medium aufgenommen und im 37°C-Brutschrank bei folgender Kinetik inkubiert: 5 min-15 min-30 min-1 h-2 h-3 h-4 h.

Nach Ablauf des jeweiligen Inkubationszeitpunktes wurden die Zellen mit 100 µl einer Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung aus dem Cytifix/Cytoperm Fixierungs/Permeabilisierung Kit (Becton Dickinson) für 20 min bei 4°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 250 µl 1x Perm/Wash-Puffer (Becton Dickinson) wurden die Zellkerne der NKL mit 100 µl einer 1:300 in 1x Perm/Wash-Puffer verdünnten DAPI-Lösung für 30 min bei RT gefärbt. Schließlich wurden die NKL-Zellen noch zweimal mit 1x Perm/Wash-Puffer und einmal mit 1x PBS gewaschen, bevor sie mit 100 µl 1x PBS auf einen Objektträger transferiert wurden. Nach Antrocknen der Zellen wurden diese in „Fluorescent Mounting“-Medium (DAKO) eingebettet und mit Nagellack eingedeckelt. Die unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte wurden schließlich unter dem CLSM (Leica) mit der passenden Software analysiert und die Bilder über die Grafiksoftware Amira 3.1.1 (Visage Imaging) ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Genexpression primärer humaner NK-Zellen nach Stimulation mit ULBP-1Fc mittels Microarray

Verschiedene Studien hatten bereits gezeigt, dass eine Stimulation des Rezeptors NKG2D durch die Interaktion mit seinen Liganden oder durch die Bindung eines gegen NKG2D gerichteten Antikörpers bei NK-Zellen im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen zu einer direkten Aktivierung führt und die Freisetzung der Zytokine IFN γ , TNF α und GM-CSF bewirkt (Jamieson et al., 2002; Billadeau et al., 2003; Zompi et al., 2003; Andre et al., 2004; Bryceson et al., 2006a). Frühere Ergebnisse konnten ebenfalls belegen, dass die Behandlung von humanen und murinen NK-Zellen mit ULBP-Liganden nicht nur die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, I-309/CCL1), sondern auch die Proliferation, die zytotoxische Aktivität und die Expression von membranständigen Aktivierungsmarkern (CD25, CD69, CD83 und CDw137) anregt (Cosman et al., 2001; Kubin et al., 2001; Sutherland et al., 2001).

Die Regulation der Genexpression von humanen NK-Zellen nach einer NKG2D-vermittelten Aktivierung ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Für die Verwendung des NKG2D-Rezeptors als Zielantigen eines immuntherapeutischen Antikörpers ist es jedoch notwendig, mehr über die Genregulation nach einer NKG2D-vermittelten Stimulation zu erfahren.

4.1.1 Experimentelles Design und Vorversuche

Zur Charakterisierung NKG2D-aktivierter humaner NK-Zellen und zur Untersuchung von Genen mit einer relativen Überexpression nach NKG2D-Stimulation, wurden Genexpressionsprofile von NKG2D-aktivierten humanen NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen mit Hilfe von Microarray-Analysen erstellt. Das experimentelle Testsystem (Abb. 12) für diese Untersuchung wurde weitgehend von Andre und Kollegen (2004) übernommen.

Hierzu wurden zunächst NK-Zellen aus Humanblut gewonnen. Die NK-Zellen wurden unter Verwendung eines Antikörpergemisches, bestehend aus Anti-CD3, Anti-CD14, Anti-CD36, Anti-CDw123, Anti-HLA Klasse II DR/DP und Anti-CD235a Antikörpern, negativ aus dem Spenderblut isoliert. Die Reinheit der auf diese Weise isolierten NK-Zellpopulation wurde mit Hilfe des FACS untersucht (Abb. 13A).

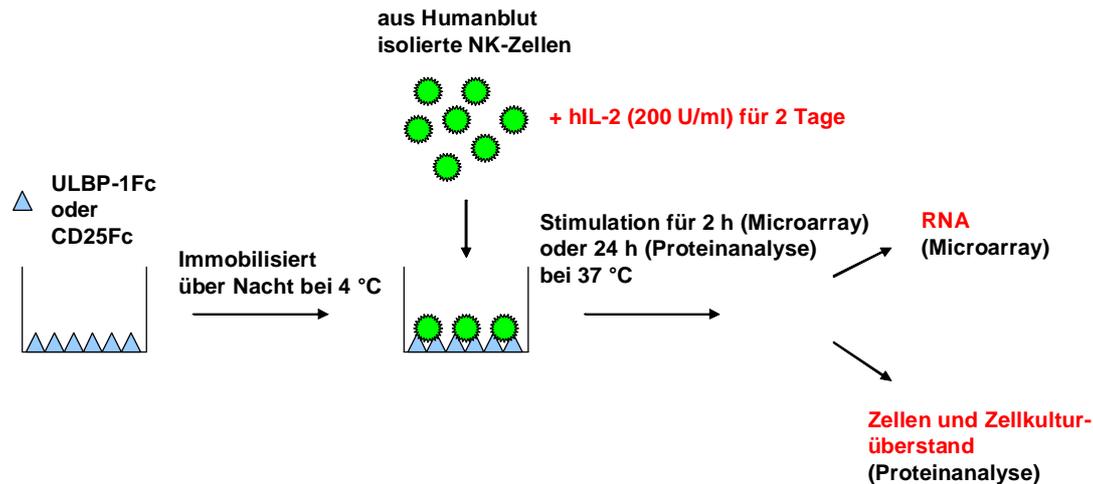


Abbildung 12: Experimentelles Design zur Untersuchung der Gen- bzw. Proteinexpression nach Stimulation von humanen NK-Zellen mit einem NKG2D-Liganden. Hierzu wurden NK-Zellen aus Humanblut isoliert und für 2 Tage mit humanem IL-2 (hIL-2) (200 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden die NK-Zellen in eine Zellkulturplatte mit immobilisierten ULBP-1Fc (10 µg/ml) oder CD25Fc (10 µg/ml) als Negativkontrolle überführt. Für die Genexpressionsanalyse im Microarray wurden die NK-Zellen für 2 h, für die Analyse der Expression von Proteinen für 24 h mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurden die Oberflächenmoleküle CD3, CD14, HLA-DR, CD56, CD16 und NKG2D als Marker verwendet. Der Reinheitsgrad der NK-Zellen lag bei mindestens 97%. In Abbildung 13A ist exemplarisch die Auswertung der FACS-Färbung eines Spenders gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die isolierte Zellpopulation weder T-Zellen (CD3), noch Monozyten (CD14), noch B-Zellen (HLA-DR) enthielt. Der Anteil CD56⁺CD16⁺ NK-Zellen betrug ca. 95%. Ca. 2% waren CD56⁻CD16⁺ und ca. 3% waren CD56⁺CD16⁻. 96% der Zellen trugen den NKG2D-Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

Die aus Humanblut verschiedener Spender isolierten NK-Zellen wurden zur Vorstimulation für zwei Tage in Medium mit rek. hIL-2 (200 U/ml) kultiviert, da verschiedene Studien gezeigt hatten, dass eine Anregung des NKG2D-Rezeptors bei ruhenden NK-Zellen alleine nicht auszureichen scheint, um eine Zytokinproduktion einzuleiten (Bryceson et al., 2006b; Kirwan & Burshtyn, 2007; Burgess et al., 2008). Anschließend wurden die vorstimulierten NK-Zellen in Abwesenheit von rek. hIL-2 in Zellkulturplatten transferiert, die mit den NKG2D-Liganden ULBP-1Fc oder MICA-Fc, bzw. dem Kontrollprotein CD25Fc beschichtet waren. Um den Einfluss von Sekundäreffekten auf die Genexpression nach NKG2D-abhängiger Aktivierung zu vermeiden, musste über eine kinetische Studie zunächst der optimale Messzeitpunkt nach Stimulation für die Microarray-Analysen ermittelt werden.

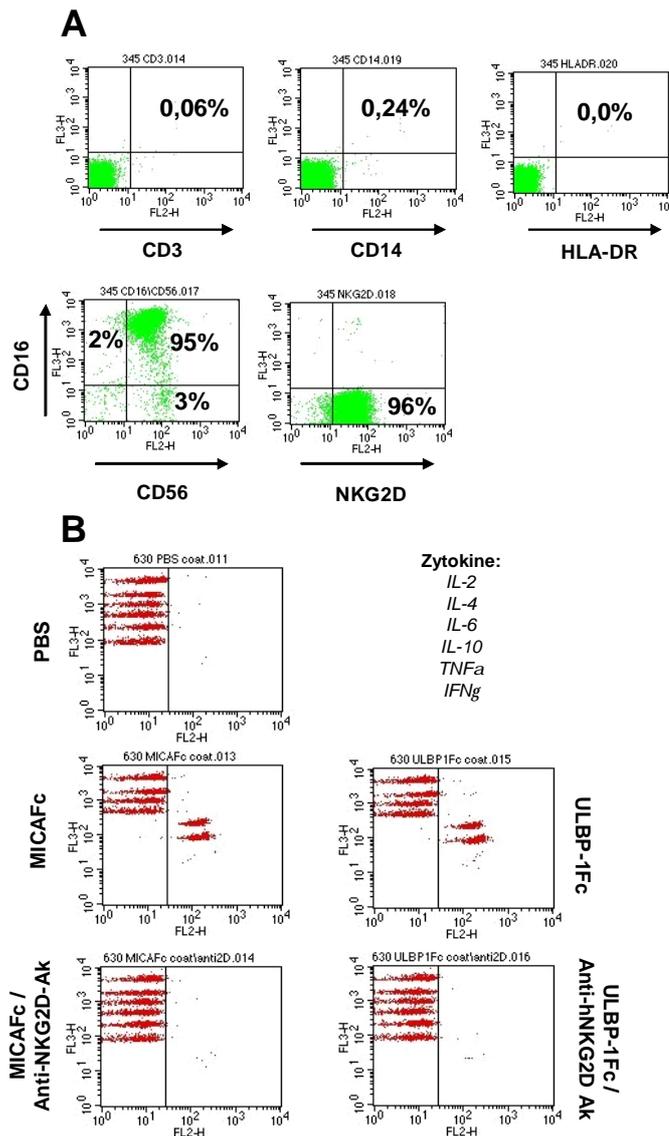


Abbildung 13: Überprüfung des experimentellen Designs zur Untersuchung der Genexpression mittels Microarray. A Nach der negativen Isolation der NK-Zellen aus dem Humanblut wurden die Zellen mittels FACS auf ihre Reinheit überprüft. Der Reinheitsgrad der NK-Zellen nach Isolation aus Spender PBMCs wurde über den T-Zellmarker CD3, Monozytenmarker CD14, B-Zellmarker HLA-DR und die NK-Zellmarker CD16, CD56 und NKG2D bestimmt. Es wurden in den Stimulationsversuchen nur NK-Zellen eingesetzt, die einem Reinheitsgrad von mindestens 97% entsprachen. **B** Mit Hilfe des CBA wurde die Effizienz der NKG2D-abhängigen Stimulation von NK-Zellen mittels FACS überprüft. Die Induktion der Zytokine TNF α und IFN γ nach Stimulation mit ULBP-1Fc oder MICA-Fc (mittlere Bildreihe) konnte durch den Einsatz eines murinen Anti-hNKG2D Antikörpers (MAB139, R&D Systems) (10 μ g/ml) geblockt werden (untere Bildreihe). Die Reihenfolge der Zytokin-Beads im FL-3 Bereich ist von oben nach unten: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α und IFN γ .

Hierzu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Zellkulturüberstände für die Messung der Zytokine IFN γ , TNF α und GM-CSF mittels CBA oder ELISA entnommen (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der Kinetik wurde der optimale Zeitpunkt der Messung auf zwei Stunden nach Stimulation festgelegt. Die Spezifität des etablierten Versuchssystems wurde durch den Einsatz eines neutralisierenden Anti-hNKG2D Antikörpers (MAB139, R&D Systems) kontrolliert (Abb. 13B). Während bei einer Stimulation der humanen NK-Zellen mit ULBP-1Fc oder MICA-Fc die Zytokine IFN γ und TNF α im Zellkulturüberstand mittels CBA am FACS nachgewiesen werden konnten (Abb. 13B, mittlere Bildreihe), wurde ihre Produktion durch den Einsatz eines Anti-hNKG2D Antikörpers vollständig unterdrückt und entsprach somit dem Zytokin-Muster der PBS- bzw. CD25Fc-Kontrolle (Abb. 13B, untere und obere Bildreihe, bzw. Daten nicht gezeigt). Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen der Vorversuche wurde der experimentelle Ansatz für die Microarray-Analysen etabliert und für vier verschiedene Spender einheitlich durchgeführt (Abb. 12).

4.1.2 Nach Aktivierung des Rezeptors NKG2D kommt es in humanen NK-Zellen ausschließlich zu einer positiven Regulation der Genexpression

Zur Untersuchung des Genexpressionsprofils humaner NK-Zellen nach NKG2D-abhängiger Aktivierung wurde als stimulierender NKG2D-Ligand ULBP-1Fc, und als Kontrollprotein CD25Fc gewählt. Nach einer Aktivierungsdauer von zwei Stunden wurden die humanen NK-Zellen der vier Spender aus den unterschiedlichen Zellkultursystemen entnommen und deren Gesamt-RNA isoliert. Zur weiteren Untersuchung des Genexpressionsprofils mit Hilfe der Microarray-Methode wurde die Gesamt-RNA der vier Spender aus den verschiedenen Versuchsansätzen an die Affymetrix core facility am Institut für medizinische Mikrobiologie der TU München (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Roland Lang) übergeben. Hier wurde die Expression der Gene aus den einzelnen Proben mit Hilfe des GeneChip Array Human Genome (HG) 133 Plus 2.0 (> 50000 Probe sets) (Affymetrix) untersucht. Die statistische Auswertung der Daten wurde von Jörg Mages, einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Roland Lang, vorgenommen. Er führte hierzu einen gepaarten t-Test durch, um das zum Teil deutlich unterschiedliche Expressionsniveau der einzelnen Spender aneinander anzugleichen. In diesem Test wurde jeweils gepaart der Unterschied in der Genexpression zwischen CD25Fc und ULBP-1Fc behandelten humanen NK-Zellen verglichen.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten, die aus insgesamt vier Replikaten und acht Arrays generiert worden waren, wurde unter Verwendung des SAM-Algorithmus getestet. Dieses Computerprogramm stellt durch wiederholte Permutation der Daten fest, ob die erhaltenen Unterschiede in der Genexpression von behandelten und unbehandelten Proben signifikant sind.

Mit Hilfe dieses statistischen Testverfahrens konnte bei einem gewählten p-Wert < 0,05 nach Stimulation mit ULBP-1Fc 292 differentiell exprimierte Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 14). Während bei einem Vergleich von CD25Fc- oder PBS-behandelten NK-Zellen keine großen Abweichungen im Genexpressionsprofil festzustellen waren (Abb. 14A), konnte hingegen im Falle einer Stimulation mit ULBP-1Fc ein deutlich abweichendes Expressionsmuster bestimmter Gene beobachtet werden. Dies konnte im Scatterplot durch eine verstärkte Bindung genspezifischer Oligonukleotid-Sonden an bestimmte Positionen des Array-Chips und somit einer zunehmenden Fluoreszenzintensität auf der Seite der ULBP-1Fc-Stimulation detektiert werden (Abb. 14B).

Auffällig bei diesem Ergebnis war die Tatsache, dass man ausschließlich eine positive Regulation der Expression bestimmter Gene beobachten konnte. Hierbei ließen sich bei 46 von 292 ermittelten differentiell exprimierten Transkripten

Fluoreszenzintensitäten messen, die bei allen vier Spendern mehr als zweifach gegenüber der Negativkontrolle erhöht waren. Diese 46 Gene wurden mit Hilfe von OMIM- und PubMed-Recherchen klassifiziert, in drei verschiedene Gruppen eingeteilt und die Mittelwerte der Abweichungen von der CD25Fc-Kontrolle (Fold Change) aller vier Spender in einem Säulendiagramm zusammengefasst (Abb. 14C).

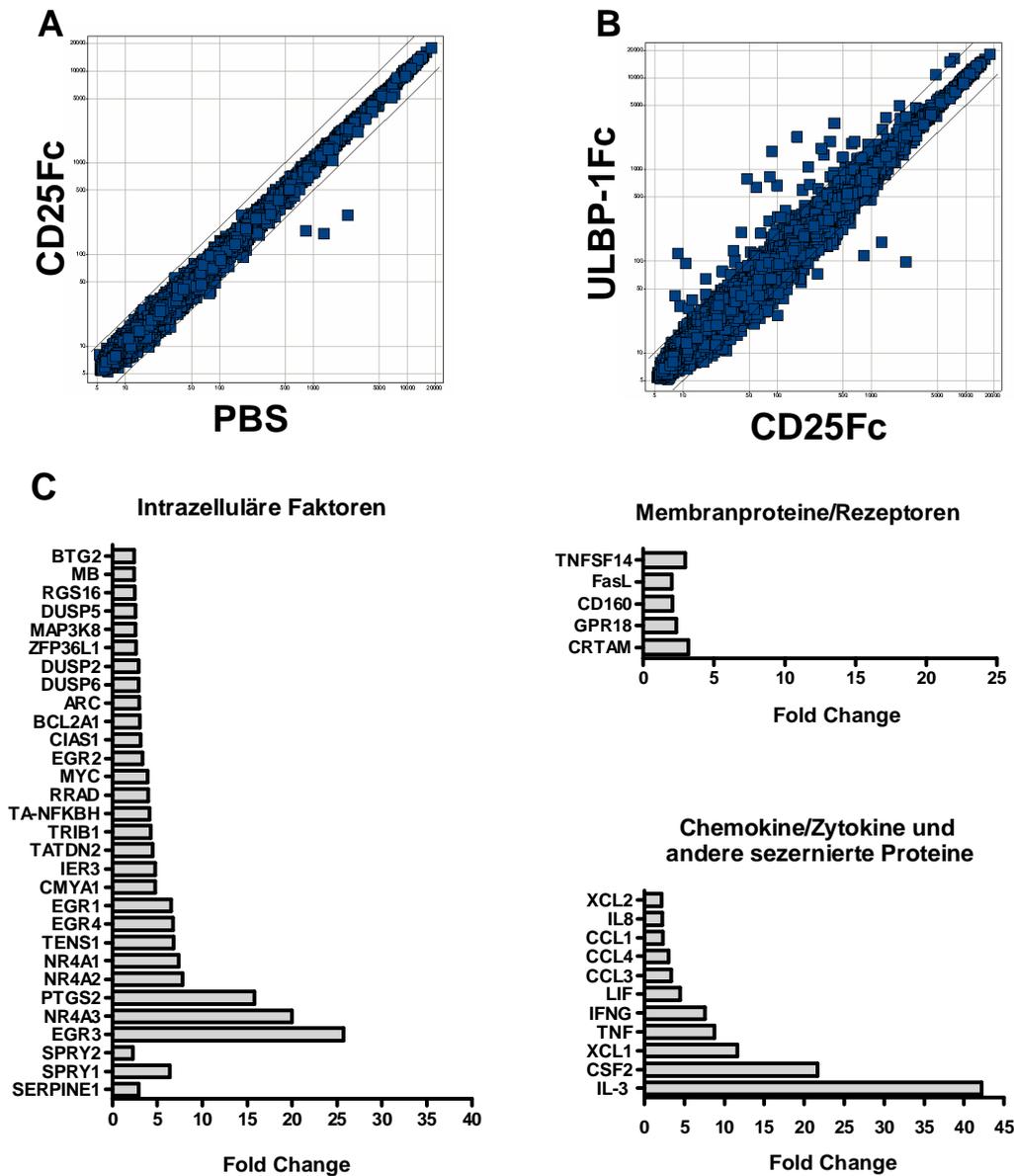


Abbildung 14: Induzierte Gene nach Stimulation von humanen NK-Zellen mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden nach Stimulation mit ULBP-1Fc 292 Transkripte differentiell exprimiert. Hiervon waren 46 Transkripte in NK-Zellen von allen vier Spendern mehr als zweifach gegenüber der Negativkontrolle hochreguliert. **A** Scatterplot eines Spenders, bei dem die Fluoreszenzintensitäten der beiden Kontrollen PBS und CD25Fc gegeneinander aufgetragen wurden. **B** In diesem Scatterplot ist die Induktion verschiedener Gene nach ULBP-1 Stimulation gezeigt. **C** In den Säulendiagrammen (x-Achse: Stärke der Hochregulation bzw. Fold Change) sind die 46 Gene dargestellt, die in allen vier Spendern mehr als zweifach hochreguliert waren. Sie wurden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Intrazelluläre Faktoren; Membranproteine und Rezeptoren; Chemokine, Zytokine und andere sezernierte Proteine. Die Statistik (gepaarter t-Test) beruht auf insgesamt 4 Replikaten und 8 Arrays, und wurde unter Verwendung des SAM Algorithmus durchgeführt. p-Wert < 0.05.

Bei Aktivierung des NKG2D-Rezeptors überwog die Expression intrazellulärer regulatorischer Faktoren.

Für die Verwendung als Biomarker bei der Charakterisierung von Anti-hNKG2D Antikörpern sind jedoch hauptsächlich extrazelluläre Faktoren wie Membranproteine oder lösliche Faktoren wie Zytokine oder Chemokine von Bedeutung, da diese leicht über Methoden wie FACS oder ELISA nachgewiesen werden können.

Folgende als Biomarker relevante Membranproteine schienen bei allen vier Spendern in ihrer Expression von einem Signal des NKG2D-Rezeptors beeinflusst zu werden: BY55 (CD160), CRTAM (Class I Restricted T Cell Associated Molecule), LIGHT (TNFS14), FasL (CD178) und GPR18.

Die mRNA des Oberflächenproteins CRTAM, das ausschließlich auf aktivierten NK- und T-Zellen exprimiert wird und mit Necl-2 (Nectin Like 2) als Ligand in Interaktion tritt (Boles et al., 2005; Fuchs & Colonna, 2006), wurde nach einer NKG2D-induzierten Aktivierung im Microarray mit 3,2-fach am stärksten von den NK-Zellen hochreguliert (Abb. 15). Für das Membranprotein TNFS14, von dem bekannt ist, dass es transient von aktivierten humanen T-Zellen exprimiert wird (Ware, 2001), erhielt man ebenfalls eine 3-fache Erhöhung der Expression. Das hauptsächlich von intestinalen intraepithelialen Lymphozyten und einem geringen Teil zirkulierender Lymphozyten (NK, $\gamma\delta$ T-Zellen, CTLs) gebildete CD160 (BY55) (Nikolova et al., 2002), der weitgehend unbekanntes G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR18 und das membranständige Protein FasL (CD178), das nach Bindung an den Fas-Rezeptor die Apoptose der Zelle induziert (Suda et al., 1993), wurden gegenüber der Negativkontrolle nur zweifach stärker transkribiert.

Neben membranständigen Proteinen wurden auch bestimmte Transkripte löslicher Faktoren infolge einer NKG2D-Stimulation in allen vier Spendern stärker exprimiert. Dazu gehörten die Zytokine $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) und IL-3, das lösliche Protein LIF (Leukemia Inhibitory Factor) und die Chemokine IL-8 (CXCL8), CCL1 (I-309), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), XCL1 (Lymphotactin- α) und XCL2 (Lymphotactin- β).

Die Auswertungen der Microarray-Analyse ergaben, dass die Transkription des Interleukins IL-3 nach Stimulation mit ULBP-1Fc mit einer mittleren Erhöhung von 42-fach hierbei am stärksten induziert wurde. Das proinflammatorische Zytokin GM-CSF bzw. CSF2, das unmittelbar neben dem IL-3-Gen kodiert und auch regulatorische Elemente mit dem IL-3-Gen teilt (Nicola, 2001; Schrader, 2001), wurde 21-fach stärker exprimiert. Das Chemokin XCL-1 wurde 12-fach, die beiden Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ wurden neun- bzw. achtfach differentiell exprimiert. Das lösliche Protein LIF wurde vierfach, die beiden Chemokine CCL3 und CCL4 dreifach und die Chemokine CCL1, XCL-2 und IL-8 jeweils zweifach stärker gegenüber der Negativkontrolle transkribiert.

4.1.3 Verifizierung möglicher NKG2D-abhängiger Biomarker auf Proteinebene

Die aus dem Microarray erhaltenen Daten zur Analyse der Genexpression basieren lediglich auf der Detektion der Menge bestimmter mRNA-Transkripte eines Gens. Als Biomarker oder neue therapeutische Zielantigene können jedoch nur Moleküle fungieren, welche auch wirklich als Protein von der Zelle hergestellt werden. Aus diesem Grund sollte die Expression interessanter Zielgene auf Proteinebene verifiziert werden. Hierzu wurde nochmals eine Stimulationskinetik durchgeführt, um einen optimalen Zeitpunkt für die Detektion der Proteine festzulegen. Es wurden hierfür zu den Zeitpunkten 8, 24 und 48 Stunden nach Stimulation die löslichen Faktoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und IL-8 im Zellkulturüberstand mit dem CBA gemessen, bzw. die Expression membranständiger Proteine wie CRTAM, TNFS14, CD160 und FasL auf den NK-Zellen mittels FACS untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Biomarker $\text{TNF}\alpha$ und CRTAM zwar sehr bald nach der Aktivierung von den NK-Zellen gebildet werden, ihre Expression allerdings bereits nach 48-72 Stunden abgeschwächt wird (Fuchs & Colonna, 2006; Wendt et al., 2006), wurde der Messzeitpunkt für alle Proteine auf 24 Stunden nach Stimulation mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc festgelegt (Abb. 12).

4.1.3.1 Infolge der Stimulation des NKG2D-Rezeptors wird das Membranprotein CRTAM verstärkt von NK-Zellen auf deren Zelloberfläche exprimiert

Zur Untersuchung der Expression der Oberflächenproteine CRTAM, CD160, TNFS14 und FasL wurden die NK-Zellen von sechs Spendern nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc oder der Negativkontrolle CD25Fc aus der Zellkultur entnommen und mit den für die Membranproteine spezifischen Antikörpern zur Detektion am FACS-Gerät behandelt.

Die Expression der Oberflächenmoleküle TNFS14 und FasL konnte weder bei unbehandelten noch bei behandelten NK-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Rezeptor CD160 konnte zwar auf NK-Zellen detektiert werden, jedoch ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen feststellen (Daten nicht gezeigt). Lediglich der Rezeptor CRTAM wurde nach einer NKG2D-vermittelten Stimulation verstärkt auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert (Abb. 15). Somit konnten die Ergebnisse des Microarray lediglich für das Oberflächenprotein CRTAM auch auf Proteinebene bestätigt werden.

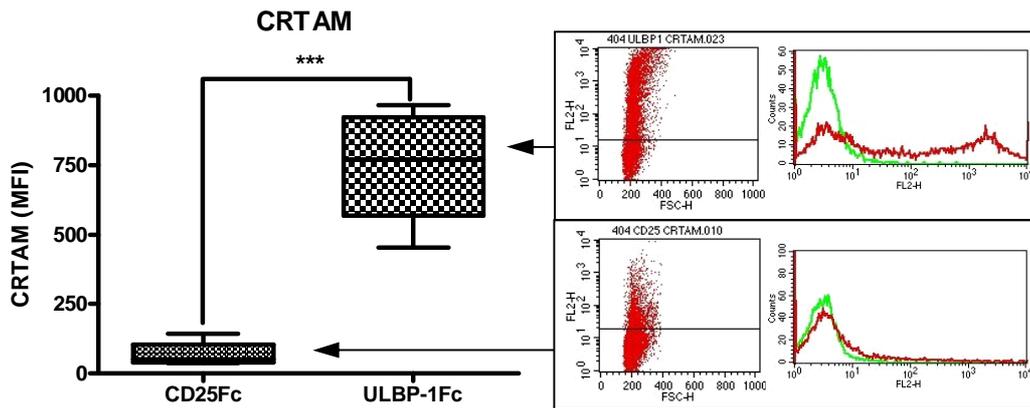


Abbildung 15: Nachweis des nach ULBP-1 Stimulation induzierten Membranproteins CRTAM auf Proteinebene. Nach einer 24 h Stimulation humaner NK-Zellen mit ULBP-1Fc oder CD25Fc (Abb. 12) wurden die Zellen im FACS auf die Expression des Oberflächenproteins CRTAM untersucht. CRTAM-Färbung (rot) bei CD25Fc-Stimulation (obere FACS-Abbildung) und nach ULBP-1Fc-Stimulation (untere FACS-Abbildung). Isotyp-Kontrolle (grün). Es wurden 6 verschiedene Spender getestet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Zur Überprüfung der Signifikanz des Ergebnisses wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. ($n = 6$, $*** p < 0.001$).

4.1.3.2 Eine NKG2D-vermittelte Aktivierung induziert in humanen NK-Zellen die Freisetzung der Zytokine IFN γ , TNF α und GM-CSF und der Chemokine IL-8, CCL3 und CCL4

Um die unterschiedlichen löslichen Faktoren, die infolge einer NKG2D-Aktivierung von NK-Zellen produziert werden können, auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Zellkulturüberstände 24 h nach Stimulation mit Hilfe des CBA oder mit Hilfe eines ELISA analysiert.

Für alle sechs Spender konnte nach Aktivierung mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc eine deutliche Zunahme in der Expression der Zytokine IFN γ (400-4000 pg/ml, $n = 6$), TNF α (20-200 pg/ml, $n = 6$) und GM-CSF (50-300 pg/ml, $n = 7$) festgestellt werden (Abb. 16). Für das Zytokin IL-3, das auf RNA-Ebene im Microarray eine deutliche Überexpression zeigte, konnte hingegen auf Proteinebene weder intrazellulär durch eine intrazelluläre FACS-Färbung, noch extrazellulär mit Hilfe des CBA ein Nachweis erbracht werden (Daten nicht gezeigt, $n = 6$).

Die Chemokine CCL3 (400-3500 pg/ml, $n = 6$) und CCL4 (500-3400 pg/ml, $n = 6$) wurden ebenfalls nach Stimulation mit ULBP-1Fc verstärkt von den humanen NK-Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert (Abb. 16). Die Detektion von IL-8 war aufgrund der niedrigen Konzentrationen in den Zellkulturüberständen (10-70 pg/ml, $n = 6$) schwierig, aber auch dieses Chemokin wurde nach einer ULBP-1Fc Stimulation stärker von den NK-Zellen freigesetzt (Abb. 16).

Eine Sezernierung von XCL1 in den Zellkulturüberstand stimulierter NK-Zellen konnte nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

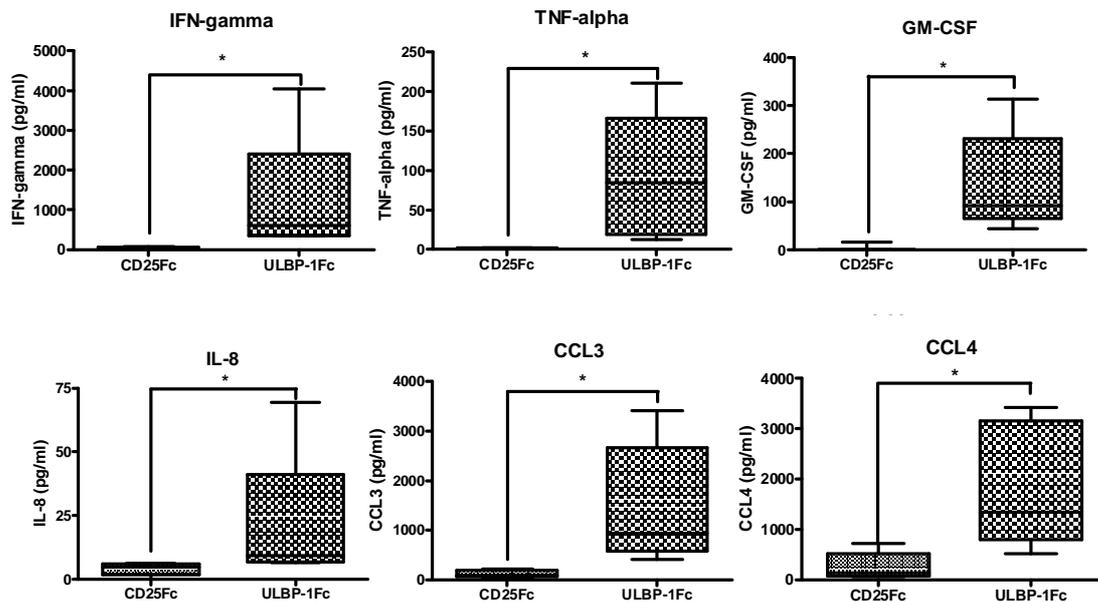


Abbildung 16: Verifizierung der im Microarray induzierten Zytokine und Chemokine auf Proteinebene. Nach Stimulation von humanen NK-Zellen für 24 h mit ULBP-1Fc oder der Negativkontrolle CD25Fc (Abb. 12) wurden die Zellkulturüberstände im CBA (IFN γ , TNF α und IL-8) oder im ELISA (GM-CSF, CCL3 und CCL4) auf Zytokine und Chemokine untersucht. Es wurden 6-8 verschiedene Spender getestet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Wilcoxon Matched Pairs Test durchgeführt. (* $p < 0.05$).

Bei Gesamtbetrachtung der Daten gab es hinsichtlich der Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen zwischen den Spendern starke Schwankungen, die durch eine unterschiedliche Konstitution der Spender bedingt sein könnte.

Da mit Hilfe des FACS kein membrangebundener FasL an der Zelloberfläche der NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde auch ein mögliches Vorhandensein von löslichem FasL in den Zellkulturüberständen getestet. Es konnte FasL aber auch nicht als lösliche Variante im ELISA gemessen werden (Daten nicht gezeigt, $n = 2$). Anhand der Ergebnisse konnte sichergestellt werden, dass die löslichen Faktoren IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-8, CCL3 und CCL4 nach Aktivierung des Rezeptors NKG2D auch eine verstärkte Expression auf Proteinebene zeigten.

4.1.4 Eine durch ULBP-1Fc-Stimulation verstärkte Expression von IL-3 und XCL1 lässt sich mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestätigen

Da nach einer Aktivierung des Rezeptors NKG2D bestimmte Faktoren wie IL-3 und XCL1 zwar im Microarray, jedoch nicht auf Proteinebene identifiziert werden konnten, sollten die aus dem Microarray erhaltenen Daten mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR nochmals auf RNA-Ebene bestätigt werden, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können.

Hierzu wurde für die Expressionsanalyse unterschiedlicher RNA-Transkripte (humanes IL-3, humanes IFN γ , humanes LIF, humanes XCL-1, humanes β -Aktin) zunächst die RNA aus stimulierten (ULBP-1Fc) und unstimulierten (CD25Fc) humanen NK-Zellen isoliert und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Inkubationszeit der humanen NK-Zellen mit dem NKG2D-Liganden bzw. mit dem Kontrollprotein CD25Fc betrug hierbei wie beim Versuchsansatz für die Analyse im Microarray zwei Stunden. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden die Transkripte der zu untersuchenden Faktoren von der cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Nach unterschiedlich langen PCR-Zyklen (24-36) wurden die unterschiedlich behandelten Proben auf ein DNA-Gel aufgetragen (Abb. 17A). Die im DNA-Gel erkennbaren DNA-Banden entsprachen alle der zu erwartenden Größe des jeweiligen PCR-Produkts. Aus dem Produkt der Bandenfläche und dem Mittelwert der Bandenhelligkeit wurde die Bandenintensität des Ziel- und des Kontrollgens berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis des Zielgens (T, d.h. IFN γ , IL-3: n = 8; LIF, XCL-1: n = 6) zum Kontrollgen (C, d.h. β -Aktin) für die Proben der CD25Fc- und ULBP-1Fc-Stimulation von unterschiedlichen Spendern ermittelt.

Dieses T/C-Verhältnis gab die relative Amplifikation des Zielgens (T) im Verhältnis zur internen β -Aktin-Kontrolle (C) an. Die T/C-Verhältnisse von stimulierten und unstimulierten humanen NK-Zellen wurden für jeden zu untersuchenden Faktor miteinander in Beziehung gesetzt und über das Statistik Programm GraphPad Prism unter Verwendung eines Wilcoxon Matched Pairs Test die Signifikanz der Daten bestimmt. Es handelt sich dabei um einen statistischen Test, der von gepaarten nicht normal verteilten Daten ausgeht.

Die Ergebnisse von 6-8 Spendern wurden in einer Box-Blot-Grafik zusammengefasst. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR konnten für die Positiv-Kontrolle IFN γ ($p < 0.05$), für IL-3 ($p < 0.01$) als auch für XCL1 ($p < 0.05$) nach Stimulation mit ULBP-1Fc gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Expressionsspiegel festgestellt werden. Die Expression der mRNA für LIF schien ebenfalls nach einer NKG2D-vermittelten Aktivierung leicht erhöht, allerdings handelte es sich hierbei um keine signifikante Änderung (Abb. 17B).

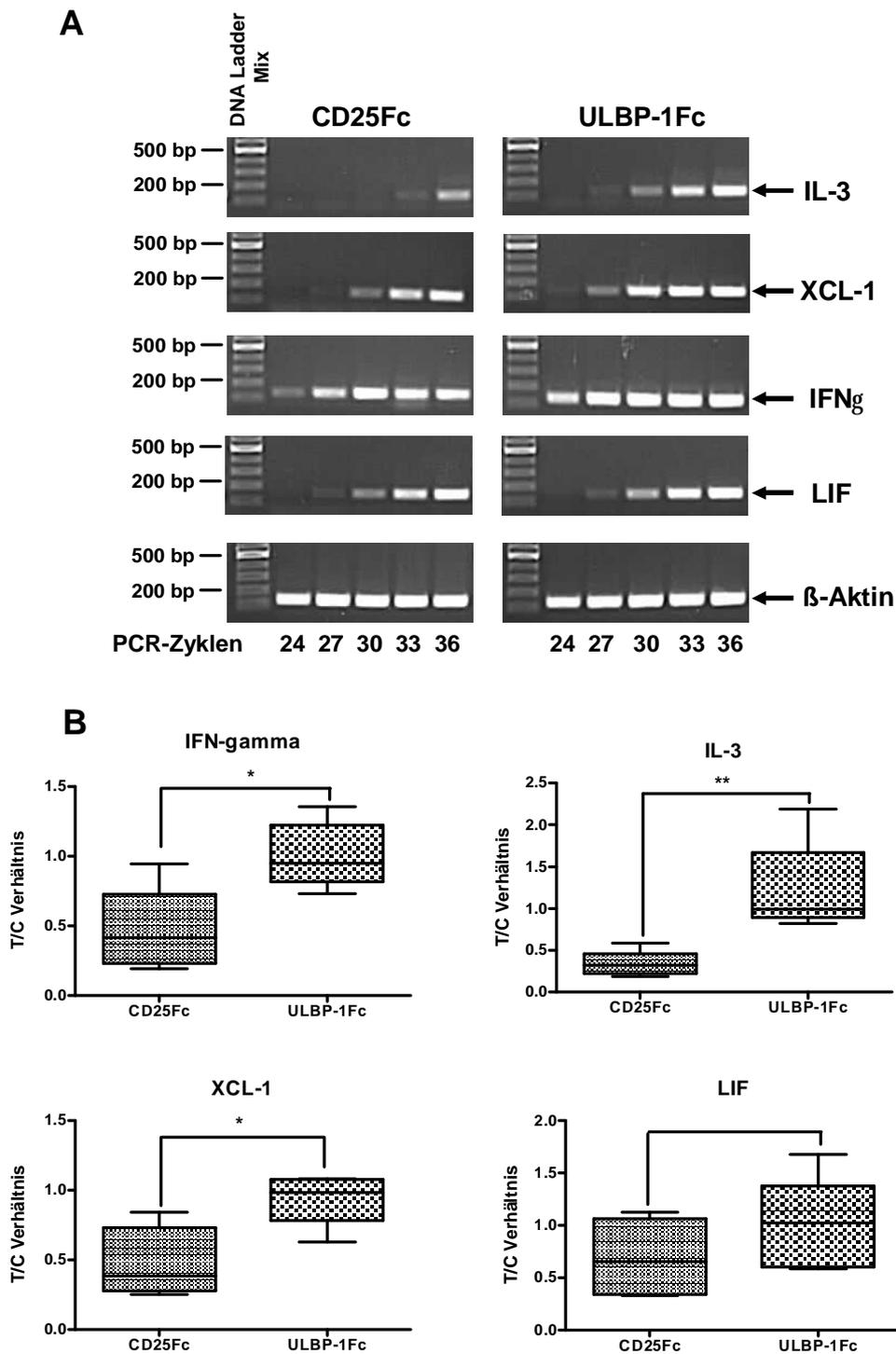


Abbildung 17: Überprüfung der Microarray Ergebnisse auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR. **A** Nach 2 h Stimulation humaner NK-Zellen mit ULBP-1Fc oder CD25Fc wurde RNA aus den NK-Zellen isoliert und die Zunahme der Zytokin- bzw. Chemokin-mRNA mit Hilfe von spezifischen Primern für β -Aktin, IFN γ , IL-3, LIF und XCL-1 in einer semiquantitativen RT-PCR untersucht. Nach unterschiedlich langen PCR-Zyklen (24-36) wurden die Proben der Negativkontrolle CD25Fc (linke Bildreihe) und der ULBP-1 Stimulation (rechte Bildreihe) auf ein DNA-Gel aufgetragen. **B** T/C gibt die relative Amplifikation des Zielgens (T) im Verhältnis zur internen β -Aktin-Kontrolle (C) an. Die Auswertung erfolgte mit der Software Lucia G Version 4.60. Aus dem Produkt der Bandenfläche und dem Mittelwert der Bandenhelligkeit (Area x MeanBrightness) wurde die Bandenintensität des Ziel- und des Kontrollgens berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis des Zielgens zum Kontrollgen für die CD25Fc-Kontrolle und die ULBP-1 Stimulation von unterschiedlichen Spendern (IFN γ , IL-3: n = 8; LIF, XCL-1: n = 6) ermittelt und in einem Box-Blot gegeneinander aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte über die Software GraphPad Prism. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Wilcoxon Matched Pairs Test durchgeführt. (* p < 0.05; ** p < 0.01).

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse zeigten, dass nach einer Signaltransduktion über den Rezeptor NKG2D ausschließlich Gene hoch, aber nicht herab reguliert wurden.

Bei der Untersuchung von membranständigen und löslichen extrazellulären Faktoren konnte für CRTAM, IFN γ , TNF α , GM-CSF, CCL3, CCL4 und IL-8 der Nachweis einer NKG2D-abhängigen Expression nicht nur auf RNA- sondern auch auf Proteinebene erbracht werden. Für IL-3 und XCL-1 konnte die Expression nach ULBP-1Fc Stimulation nur auf RNA-Ebene gezeigt werden.

Die Proteine CRTAM, IFN γ , TNF α und GM-CSF, die hier nachweislich einer NKG2D-vermittelten Expression unterlagen, können somit als Biomarker zur Untersuchung der biologischen Funktionalität humaner Anti-hNKG2D Antikörper verwendet werden.

4.2 Generierung eines humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörpers

Ogasawara und Kollegen (2004) konnten in einem T1DM-Tiermodell mit NOD-Mäusen zeigen, dass eine Inhibierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion mit Hilfe eines neutralisierenden Antikörpers den Krankheitsverlauf stoppt oder zumindest mildert. Außerdem gibt es auch im Humansystem für bestimmte Autoimmunerkrankungen wie Zöliakie und RA eindeutige Hinweise dafür, dass der NKG2D-Rezeptor bei der Entwicklung des Krankheitsverlaufs eine zentrale Rolle spielt (Groh et al., 2003; Martin-Pagola et al., 2003; Goronzy & Weyand, 2004; Hüe et al., 2004; Caillat-Zucman, 2006). Diese Studien wurden zum Anlass genommen, einen immuntherapeutischen Anti-hNKG2D Antikörper zu entwickeln und diesen für einen möglichen Einsatz bei Autoimmunerkrankungen im Menschen zu humanisieren. Bei der Entwicklung der Anti-hNKG2D Antikörper sollte das Hauptaugenmerk auf deren neutralisierende Wirkung bei einer NKG2D-induzierten Zellyse durch humane NK-Zellen gerichtet werden. Da humane NK-Zellen im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen durch eine Stimulation des NKG2D-Rezeptors direkt aktiviert werden können, sollten diese als Zielzellen für eine Charakterisierung der Antikörperfunktionen verwendet werden.

4.2.1 Charakterisierung monoklonaler muriner Anti-hNKG2D Antikörper

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppen von Roman Kischel und Ralf Lutterbüse (Micromet AG) waren vier verschiedene murine monoklonale Anti-hNKG2D Antikörper (mIgG1: 6H7, 11B2D10; mIgG2b: 6E5A7 und 8G7E10) durch die Immunisierung von Mäusen mit löslichem hNKG2D generiert worden (Abb. 18). Zur Induktion einer Immunreaktion gegen hNKG2D war hierfür die extrazelluläre Domäne des hNKG2D-Proteins wiederholt in Mäuse intraperitoneal injiziert worden. Bei einem ausreichenden Anti-hNKG2D Serumtiter waren die Tiere getötet und die Milzen der Mäuse isoliert worden. Aus den geernteten Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden mit Hilfe der Hybridomtechnologie antikörperproduzierende Klone gewonnen.

Diese Antikörper sollten hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in unterschiedlichen Testsystemen analysiert werden. Die Ergebnisse sollten eine erste qualitative Einschätzung der murinen Antikörper ermöglichen und erste Anhaltspunkte für einen möglichen therapeutischen Einsatzbereich liefern. Anhand dieser Daten sollte letztendlich eine Vorauswahl geeigneter Antikörper stattfinden.

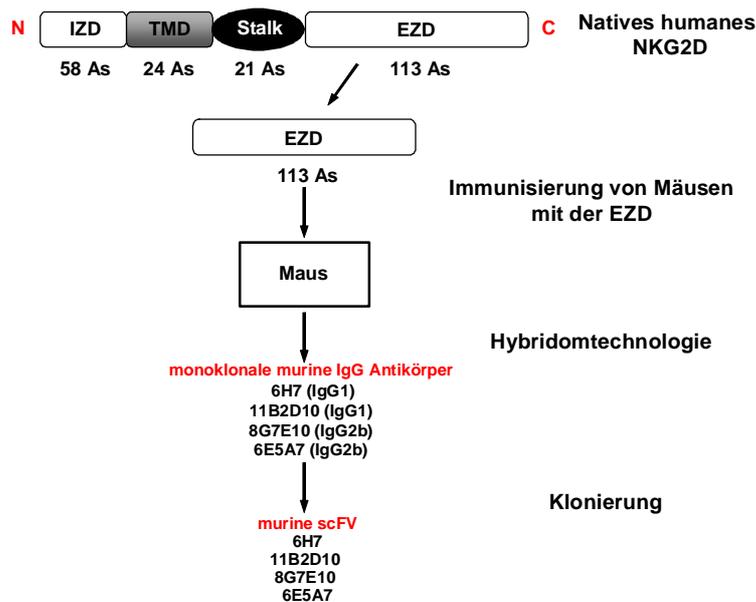


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Generierung muriner Anti-hNKG2D Antikörper und scFv-Fragmenten aus immunisierten Mäusen. Abkürzungen: IZD: Intrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrane Domäne; EZD: Extrazelluläre Domäne.

4.2.1.1 Die murinen Anti-hNKG2D Antikörper binden an membranständiges NKG2D von CHO-Transfektanten und können eine Interaktion mit dem Liganden ULBP-2Fc kompetitieren

Zunächst wurde die Bindungsfähigkeit der murinen Anti-hNKG2D Antikörper 6H7, 11B2D10, 6E5A7 und 8G7E10 an membranständiges NKG2D getestet. Hierzu wurden CHO-Zellen, die mit hNKG2D und hDAP10 transfiziert waren, mit den unterschiedlichen Antikörpern inkubiert und deren Bindung an die Zelle am FACS untersucht (Abb. 19A). Während man bei den Isotyp-Kontrollen für mIgG1- und mIgG2b-Antikörper keine Bindung an die CHO-hNKG2D⁺⁺/hDAP10⁺⁺-Zellen detektieren konnte, ließ sich die Bindungsaktivität der murinen Anti-hNKG2D Antikörper deutlich im FACS-Histogramm nachweisen (Abb. 19A). Eine Behandlung untransfizierter CHO-Zellen mit den Anti-hNKG2D Antikörpern ließ ebenfalls keine unspezifische Bindung erkennen (Daten nicht gezeigt).

Eine Bindung der murinen Anti-hNKG2D Antikörper an reduziertes hNKG2D im Westernblot konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies ließ vermuten, dass die Antikörper eher ein konformationsbedingtes Epitop im NKG2D-Protein erkennen.

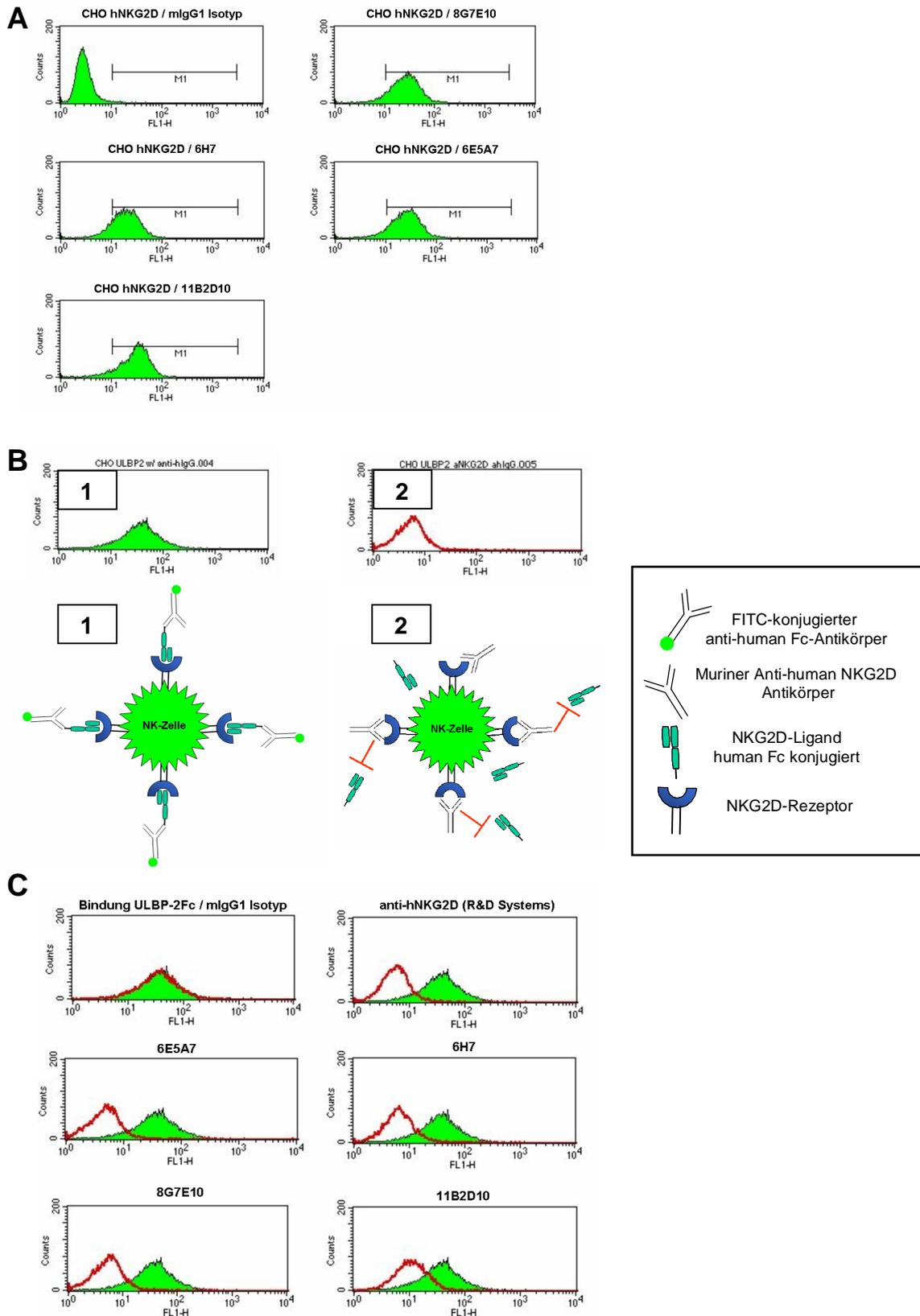


Abbildung 19: Bindungs- und Kompetenzeigenschaften der murinen Anti-hNKG2D Antikörper.
A Am FACS wurde die Bindung der einzelnen murinen Anti-hNKG2D Antikörper (6H7, 11B2D10, 8G7E10, 6E5A7) (5 µg/ml) auf hNKG2D positiven CHO-Transfektanten untersucht. Die Isotyp-Kontrolle mIgG1 war identisch mit der mIgG2b Isotyp-Kontrolle. **B** Schematische Darstellung eines Kompetitionsexperimentes: **1:** Detektion der maximalen Bindung des NKG2D-Liganden ULBP-2Fc an den NKG2D-Rezeptor. **2:** Blockierung der Liganden-Bindung durch die Vorinkubation mit Anti-hNKG2D Antikörpern. **C** Die vier unterschiedlichen Antikörper wurden in ihrer Fähigkeit, die Bindung eines NKG2D-Liganden an den NKG2D-Rezeptor zu blockieren, getestet. Bindung des Liganden ULBP-2Fc (1 µg) an NKG2D (grün); Blockierung der ULBP-2Fc-Bindung durch den Antikörper (5 µg/ml) (rot).

Weiterhin wurde untersucht, ob durch eine Bindung der Anti-hNKG2D Antikörper die Interaktion zwischen dem NKG2D-Rezeptor und seinem Liganden inhibiert werden kann, um somit eine biologische Funktionalität der Antikörper festzustellen. Dies wurde mit Hilfe eines Kompletions-Experimentes am FACS analysiert. In diesem Versuchsansatz wurde zunächst das maximale Bindungssignal des NKG2D-Liganden an die Zelloberfläche der CHO-hNKG2D⁺⁺/hDAP10⁺⁺-Zellen ermittelt.

Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit einem ULBP-2Fc-Fusionsprotein inkubiert und die Bindung anschließend über den humanen Fc-Teil des Fusionsproteins durch Zugabe eines FITC-konjugierten Ziege Anti-human-Antikörpers detektiert (Abb. 19B/1). Auf diese Weise konnte eine Bindung des ULBP-2Fc an CHO-hNKG2D⁺⁺/hDAP10⁺⁺-Zellen nachgewiesen werden. Diese Bindung des Liganden konnte nun durch den Einsatz von Anti-hNKG2D Antikörpern reduziert oder vollständig geblockt werden (Abb. 19B/2). Die Zellen wurden zur Untersuchung der Kompetitionseigenschaften vor Zugabe des Liganden mit den jeweiligen Antikörpern oder deren Isotyp-Kontrollen vorinkubiert.

Alle vier murinen Anti-hNKG2D Antikörper konnten im Gegensatz zu den Isotyp-Kontrollen eine deutliche Reduktion des ULBP-2Fc-Bindungssignals bewirken (Abb. 19C), wobei der Antikörper 11B2D10 im Vergleich zu den anderen Antikörpern eine Ligandenbindung an den NKG2D-Rezeptor schlechter zu kompetitieren schien.

4.2.1.2 Vorversuche zur Etablierung von Zytotoxizitätsstudien mit murinen Anti-hNKG2D Antikörpern

Für einen späteren immuntherapeutischen Einsatz der Anti-hNKG2D Antikörper bei Autoimmunerkrankungen sollte der Nachweis erbracht werden, dass der Antikörper in der Lage ist, eine NKG2D-vermittelte Lyse der Zielzelle zu inhibieren. Außerdem sollte geklärt werden, ob ein vollständiger Antikörper aufgrund von Kreuzvernetzung eine Aktivierung des NKG2D-Rezeptors induzieren könnte.

Die murinen Anti-hNKG2D Antikörper wurden hierfür in zwei verschiedenen *in vitro* Zytotoxizitätsstudien, d.h. im standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay und im Redirected Lysis-Assay, getestet. Das erst genannte Testsystem diene hierbei der Untersuchung blockierender Eigenschaften der Anti-hNKG2D Antikörper, während das Andere eher der Analyse der Fähigkeit zur Zytotoxizitätsinduktion diene. Um einen einwandfreien Ablauf dieser Studien gewährleisten zu können, wurden zuvor alle Zelllinien, die für die Durchführung dieser Tests benötigt wurden, mit Hilfe des FACS auf die spezifische Expression bestimmter für den Versuch essentieller Zelloberflächenmoleküle untersucht.

In den Experimenten wurden NKL-Zellen als Effektoren eingesetzt. Anhand spezifischer FACS-Färbungen konnte bei den NKL-Zellen eine intakte Expression der Oberflächenmoleküle NKG2D und DAP10 festgestellt werden. Des Weiteren konnte intrazellulär eine für Zytotoxizitätsstudien ausreichende Menge an Granzym B und Perforin gemessen werden (Abb. 20A, linke äußere Bildreihe). Die NKL-Zellen waren demnach voll funktionsfähig und konnten für die folgenden Zytotoxizitätsanalysen als Effektorzellen verwendet werden.

Auch die Zielzellen mussten auf ihre Tauglichkeit hin untersucht werden. Hierzu wurde ebenfalls die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle durch FACS-Färbungen kontrolliert. Die für den standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay benötigte, mit NKG2D-Liganden (ULBP-2 oder MICA) transfizierte BaF/3-Zelllinie konnte freundlicherweise von einem Kooperationslabor am DKFZ in Heidelberg (Arbeitsgruppen von A. Cerwenka und C. Watzl) erhalten werden. Die Expression der NKG2D-Liganden auf den BaF/3-Zellen wurde unter Verwendung Liganden-spezifischer Antikörper am FACS kontrolliert. Anhand der FACS-Daten konnte eine Expression der NKG2D-Liganden MICA und ULBP-2 auf den jeweiligen BaF/3-Transfektanten nachgewiesen werden, während eine Kontroll-Transfektante wie erwartet keine Expression der Moleküle zeigte (Abb. 20A, mittlere drei Bildreihen).

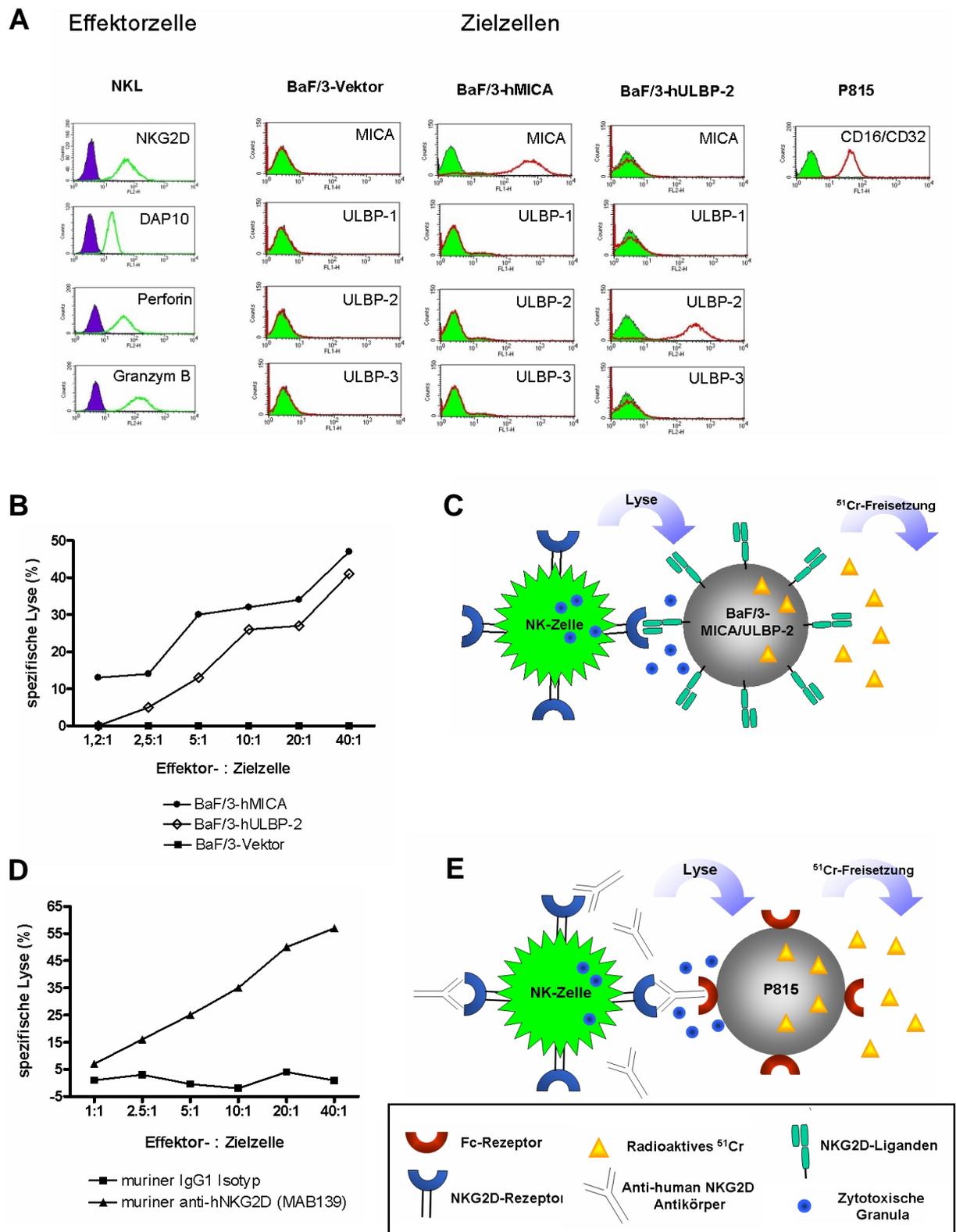


Abbildung 20: Vorversuche zu den Zytotoxizitätstests mittels radioaktivem Chrom. **A** Am FACS wurden sowohl die Expressionseigenschaften der Effektor- als auch der Zielzellen untersucht. Isotypkontrollen sind lila oder grün (gefüllt), die spezifische Bindung an das jeweilige Antigen ist grün oder rot (ungefüllt) dargestellt. **B** Im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay wurde das optimale Verhältnis von NKG2D-Liganden tragenden Zellen (BaF/3-hMICA; BaF/3-hULBP-2) zu NKG2D-positiven NKL Effektorzellen ermittelt. MICA tragende Zielzellen in Kokultur mit NKL (●), ULBP-2 tragende Zielzellen in Kokultur mit NKL (◇), NKG2D-Liganden negative Kontrollzellen in Kokultur mit NKL (■). **C** Schematische Darstellung des ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay mittels radioaktivem Chrom. **D** Im Redirected Lysis-Assay wurde sowohl das optimale Verhältnis von Effektor- (NKL) zu Zielzellen (P815) ermittelt, als auch die Fähigkeit eines murinen Anti-hNKG2D Antikörpers (MAB139, R&D Systems) nach Bindung an den NKG2D-Rezeptor Fc-Rezeptor positive Zellen (CD16/CD32) zu lysieren. Kokultur von NKL und P815 mit einer Isotypkontrolle (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (■), Kokultur von NKL und P815 in Gegenwart eines Anti-hNKG2D Antikörpers (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (▲). **E** Schematische Darstellung eines Redirected Lysis-Experimentes.

Für das Redirected Lysis-Experiment wurde die Zelllinie P815 verwendet. Diese sollte ausreichend Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, da bei diesem Versuch die NKL-vermittelte Lyse der P815-Zellen durch die Kreuzvernetzung von Fc-Rezeptor-gebundenen Anti-hNKG2D Antikörpern induziert wird. Eine Expression des Fc-Rezeptors (CD16/CD32) auf P815-Zellen konnte mittels FACS-Färbung bestätigt werden (Abb. 20A, Bild oben rechts).

Das Prinzip des standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay, das bereits von Cerwenka und Lanier (2001) zur Untersuchung einer NKG2D-vermittelten Lyse beschrieben wurde, beruht auf der Verwendung von mit radioaktivem ^{51}Cr beladenen Zielzellen. Diese werden nach Interaktion mit der Effektorzelle lysiert und setzen das radioaktive ^{51}Cr in das Zellkulturmedium frei. Die von den Zielzellen freigesetzte Radioaktivität kann wiederum von einem Gammazähler detektiert werden. Mit Hilfe der Messwerte für die Minimallyse (radioaktive Zielzellen ohne Effektoren) und für die Maximallyse (radioaktive Zielzellen mit TritonX-Lösung behandelt) kann mit den gemessenen Daten die spezifische Effektor-abhängige Lyse der Zielzellen über eine bestimmte Formel berechnet werden (Kapitel 3, 3.11.3.1).

Im Falle der Untersuchung von Anti-hNKG2D Antikörpern in diesem experimentellen Ansatz führt die Interaktion des NKG2D-Rezeptors auf NKL-Zellen mit einem seiner Liganden (MICA oder ULBP-2) auf ^{51}Cr -beladenen BaF/3-Zellen zur Freisetzung von Perforinen und Granzymen aus den zytotoxischen Granula der NK-Zellen und somit zur Lyse der Zielzelle. Durch die Lyse der Zielzelle wird das radioaktive ^{51}Cr in das Zellkulturmedium freigesetzt (Abb. 20C). Um bei diesem Versuch gut auswertbare Messdaten zu erhalten, wurde zunächst das Verhältnis der Effektoren zu ihren Zielzellen optimiert. Hierzu wurde die spezifische Lyse sechs verschiedener Effektor- zu Zielzell-Verhältnisse (1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1 und 40:1) untersucht.

Sowohl für die Kokultur der NKL-Zellen mit BaF/3-hMICA- als auch BaF/3-hULBP-2-Zellen stellte sich ein Verhältnis von 40:1 mit einer spezifischen Lyse zwischen 40% und 50% als optimal heraus (Abb. 20B) und wurde für alle folgenden ^{51}Cr -Freisetzungs-Assays übernommen.

Im Gegensatz zum standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay findet bei einem Redirected Lysis-Experiment nur dann eine Lyse der Zielzelle statt, wenn ein Anti-hNKG2D Antikörper mit seinen zwei Fab-Armen an das NKG2D auf NKL-Zellen und gleichzeitig über seinen Fc-Teil an den Fc-Rezeptor auf P815-Zellen bindet. Erst durch die dabei stattfindende Kreuzvernetzung des Anti-hNKG2D Antikörpers kann die mit radioaktivem ^{51}Cr beladene P815-Zelle lysiert werden und somit messbare Radioaktivität in das Zellkulturmedium freigesetzt werden (Abb. 20E). Diese Zytotoxizitäts-induzierende

Wirkung von Anti-hNKG2D Antikörpern in diesem experimentellen Ansatz wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Pende et al., 2001; Andre et al., 2004).

Auch im Falle des Redirected Lysis-Assay musste daher zunächst das optimale Effektor- zu Zielzell-Verhältnis bestimmt werden. Mit einer spezifischen Lyse von ca. 55% schien auch hier ein Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle mit 40:1 optimal zu sein (Abb. 20D). Nachdem die Testsysteme optimiert worden waren, konnten sie nun für die Charakterisierung der murinen Anti-hNKG2D Antikörper verwendet werden.

4.2.1.3 Die murinen Anti-hNKG2D Antikörper können eine NKG2D-vermittelte Lyse sowohl blockieren als auch induzieren

Zur Analyse der biologischen Aktivität der Anti-hNKG2D Antikörper *in vitro* wurden Studien mit Hilfe von mit radioaktivem ^{51}Cr beladenen Zielzellen durchgeführt.

Unter Verwendung des standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay sollte die Fähigkeit der Antikörper, eine NKG2D-vermittelte Zellyse zu inhibieren, untersucht werden. Besitzt ein Anti-hNKG2D Antikörper antagonistische Eigenschaften, so wird er die Bindung des Liganden auf der Zielzelle an den NKG2D-Rezeptor auf der Effektorzelle unterbinden. Somit würde die NKG2D-vermittelte Zielzellyse und die damit zusammenhängende Freisetzung des radioaktiven ^{51}Cr (Abb. 21B) blockiert werden. Ähnliche Versuche mit unterschiedlichen NK-Zellen, Tumorzellen oder Anti-hNKG2D Antikörpern sind bereits aus der Literatur bekannt (Pende et al., 2001; Pende et al., 2002).

Für den Versuchsansatz wurden die NKL-Effektoren vor ihrer Inkubation mit BaF/3-hMICA-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Anti-hNKG2D Antikörper behandelt.

Als positive Kontrolle wurde der Anti-hNKG2D Antikörper MAB139 (R&D Systems), der bereits in der Literatur als blockierender Antikörper beschrieben worden war und häufig für den Nachweis einer NKG2D-vermittelten Lyse im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay verwendet wird (Waldhauer & Steinle, 2006), mitgeführt. Die höchste eingesetzte Antikörperkonzentration betrug hierbei 20 $\mu\text{g/ml}$ und wurde in 1:5-Verdünnungsschritten zu einer Konzentration von 0,41 $\mu\text{g/ml}$ herabgesetzt. Während die Inkubation der NKL-Zellen mit den Isotyp-Kontrollen zu keiner Inhibierung der Zielzellyse führte, konnte durch den Einsatz der unterschiedlichen murinen Anti-hNKG2D Antikörper die spezifische Lyse der BaF/3-hMICA-Zellen von 30-40% in jedem Fall verringert werden (Abb. 21A). Allerdings ließen sich bei den murinen Anti-hNKG2D Antikörpern deutliche qualitative Unterschiede feststellen. Hierbei wiesen die Antikörper 6E5A7 und 8G7E10 im Vergleich zu den Antikörpern 6H7 und 11B2D10 eine bessere Inhibierung der Zielzellyse auf. Der

Antikörper 11B2D10 war selbst bei höchster Konzentration nicht dazu in der Lage, die spezifische Lyse auf den Basalwert abzusenken (Abb. 21A).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Auswertung der Redirected Lysis-Experimente, allerdings wurden hier die Aktivierungs- und nicht die Inhibierungseigenschaften der unterschiedlichen Antikörper getestet. Die NKL-Zellen wurden hierbei ebenfalls mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ bis 28 pg/ml in 1:3-Verdünnungen der Anti-hNKG2D Antikörper behandelt und anschließend zusammen mit der ^{51}Cr -beladenen Zielzelllinie P815 kultiviert. Auch bei diesem Versuchsansatz wurde der Anti-hNKG2D Antikörper MAB139 als Kontrollantikörper verwendet. In diesem Assay schnitten die beiden Antikörper 6E5A7 und 8G7E10, die bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen eine Zielzellyse induzieren konnten, ebenfalls deutlich besser ab als die Antikörper 6H7 und 11B2D10. Die Spezifität der Anti-hNKG2D Antikörper in diesem Experiment wurde durch den Einsatz entsprechender Isotyp-Kontrollen sichergestellt.

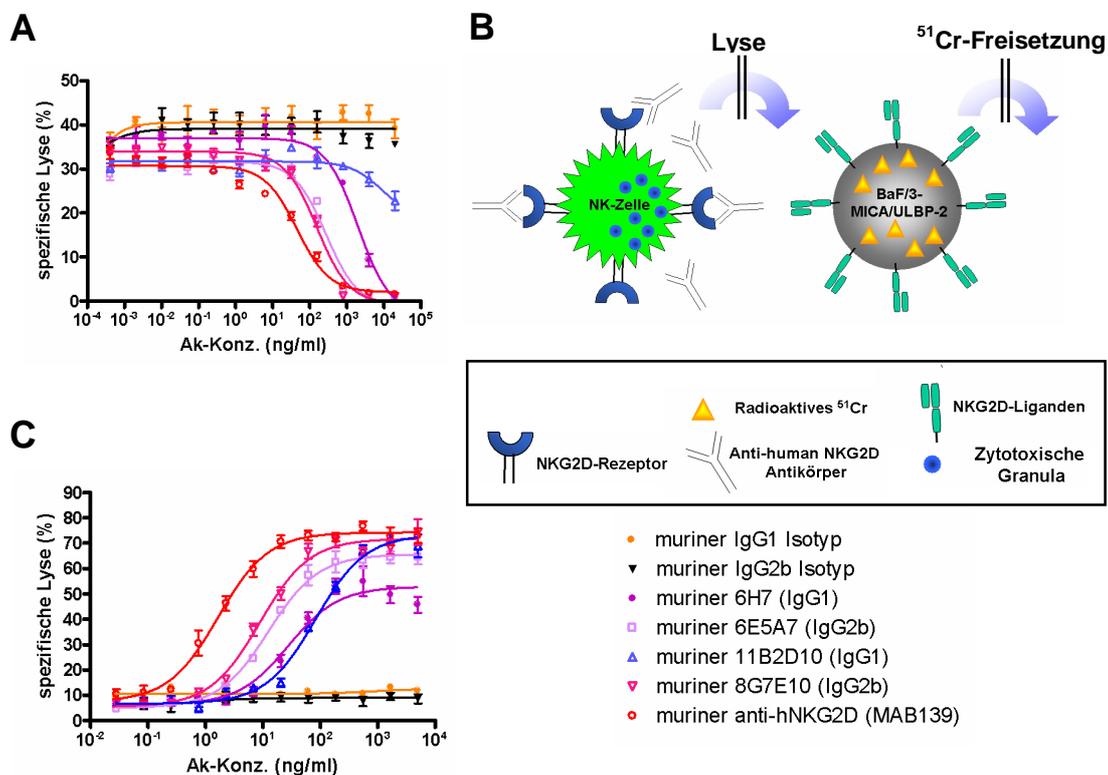


Abbildung 21: Untersuchung der murinen Anti-hNKG2D Antikörper im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay. **A** In diesem Experiment wurde die Fähigkeit der Antikörper untersucht, die Lyse NKG2D-Liganden tragender Zellen (BaF/3-hMICA) durch NKL-Zellen bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (1:5-Verdünnungen) zu blockieren. **B** Schematische Darstellung des ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay zur Untersuchung der Blockierungseffektivität von Anti-hNKG2D Antikörpern. **C** In diesem Versuch wurden die Antikörper (1:3-Verdünnungen) auf ihre Fähigkeit, nach Bindung an NKL-Zellen Fc-Rezeptor positive P815 Zellen zu lysieren (Redirected Lysis-Assay), geprüft. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen in der Kokultur betrug in beiden Experimenten 40:1. Die Messungen am Gammazähler wurden in Triplikaten durchgeführt. In den Graphen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für je drei unabhängige Experimente.

Anhand der in FACS-Experimenten, im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay und im Redirected Lysis-Assay generierten Daten der murinen Anti-hNKG2D Antikörper 6H7, 11B2D10,

6E5A7 und 8G7E10 konnte eine Auswahl für die Humanisierung zweier muriner Antikörper getroffen werden. Da eine ausreichende biologische Aktivität von 6E5A7 in allen Vorversuchen nachgewiesen werden konnte, wurde dieser monoklonale Antikörper für den folgenden Humanisierungsprozess ausgewählt. Auf die Humanisierung des Antikörpers 8G7E10, mit dem in den oben genannten Versuchen ebenso wie mit dem 6E5A7 gute Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde verzichtet, da sich die Proteinsequenzen dieser beiden Antikörper lediglich in einer Aminosäure unterschieden. Stattdessen sollte zusätzlich der 6H7 Antikörper humanisiert werden, da hier die Möglichkeit bestand, seine Bindungseigenschaften durch das Phagen-Display zu verbessern. Die Humanisierung der beiden gewählten murinen Anti-hNKG2D erfolgte im scFv-Format, das für beide Antikörper bereits existierte (Abb. 18).

4.2.2 Herstellung eines biotinylierten humanen NKG2D-Proteins für den Einsatz als Antigen im Platten-Panning-Verfahren

Um beim Humanisierungsprozess der murinen Anti-hNKG2D-scFv antigenspezifisch-bindende scFv-Phagen mit der Methode des Pannings auf Streptavidin-Platten selektionieren zu können, wurde zunächst ein biotinyliertes lösliches humanes NKG2D-Protein benötigt. Hierzu wurde ein pEFdhfr-Expressionsplasmid für ein His₆-markiertes lösliches humanes NKG2D (His₆solhNKG2D)-Protein durch transiente Transfektion in HEK293-F Suspensions-Zellen eingebracht. Vor der Isolation des Proteins aus dem Zellkulturüberstand wurde die Produktion und die biologische Aktivität des His₆solhNKG2D-Protein mittels FACS überprüft. Dazu wurde eine Bindung des im Zellkulturüberstand befindlichen NKG2D-Proteins an BaF/3-hMICA-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Aufreinigung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand erfolgte über die Methode der immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) an einem Äkta FPLC System und einer nachfolgenden Gelfiltration (Abb. 22A). Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Patrick Hoffmann (Micromet AG). Aufgrund der Tatsache, dass sich das Protein NKG2D im Gel nicht mit Coomassie-Blau anfärben ließ, musste hierzu eine Silberfärbung durchgeführt werden. Mit Hilfe von SDS-PAGE, anschließender Silberfärbung des Gels (Abb. 22B) und einem Westernblot (Abb. 22C) konnte die Reinheit des Proteins festgestellt werden. Im Proteingel wurden der Zellkulturüberstand der NKG2D-Transfektion, der Durchlauf und die beiden Fraktionen (10% und 100% Imidazol) der IMAC-Aufreinigung und die drei bei der Gelfiltration erhaltenen Protein-Peaks (P1, P2 und P3) aufgetragen. Sowohl in der 100% Imidazol- als auch in der P2- und P3-Fraktion der anschließenden Gelfiltration war das

His₆solhNKG2D-Protein, das je nach Glykosylierungsgrad als Monomer eine Größe von 17-26 kDa, bzw. als Dimer von 34-52 kDa besitzen kann, deutlich zu erkennen.

Der Glykosylierungsgrad lässt sich über die in der Proteinsequenz vorhandenen Glykosylierungsstellen, welche durch die Sequenzabfolge NXS oder T (mit X ≠ P) gekennzeichnet sind, ermitteln. Pro Glykosylierungsstelle werden hierbei 2-3 kDa zur eigentlichen Proteingröße hinzuaddiert.

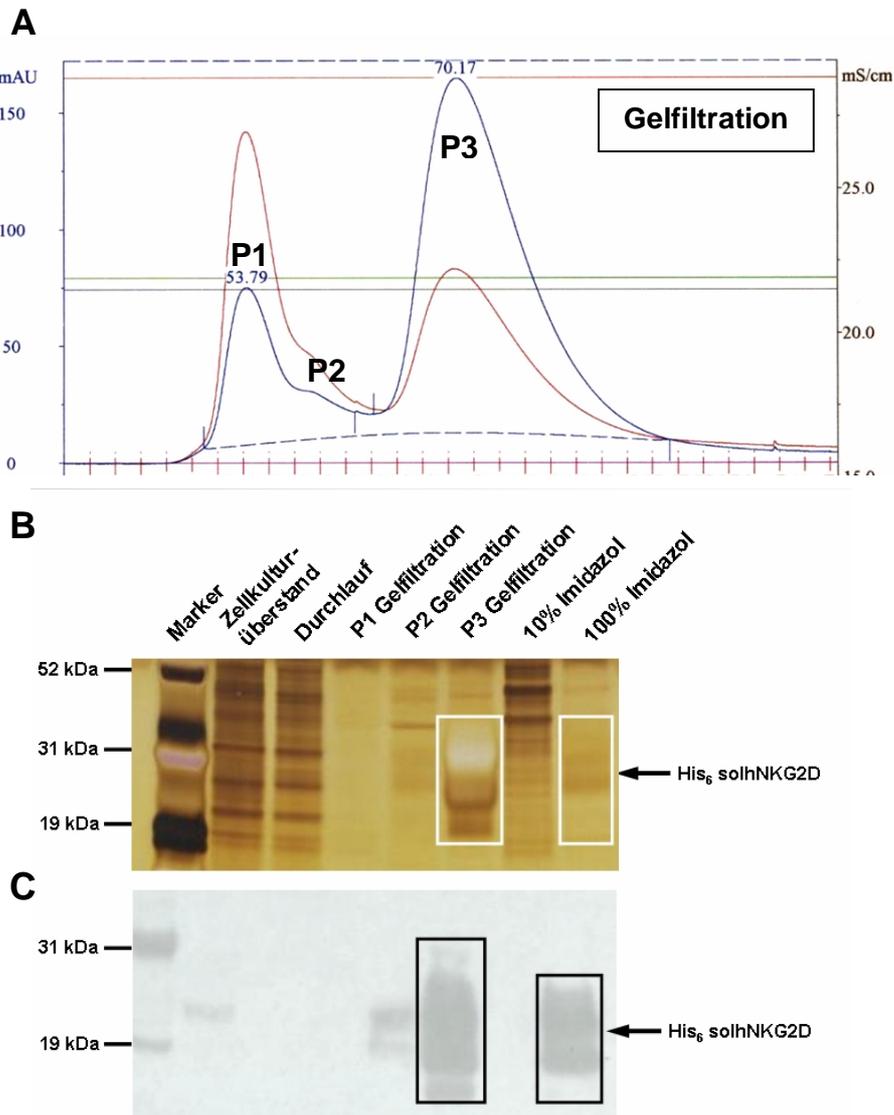


Abbildung 22: Aufreinigung eines löslichen humanen NKG2D Proteins mit His-Markierung. **A** Chromatogramm nach Aufreinigung des löslichen humanen NKG2D über eine Metallaffinitätschromatographie (IMAC) und anschließender Gelfiltration. Blaue Linie: UV1 280 nm, Rote Linie: UV2 254 nm **B** Silbergel der unterschiedlichen Aufreinigungsstufen des NKG2D Proteins. **C** Westernblot der unterschiedlichen Aufreinigungsstufen des NKG2D Proteins. Die Detektion erfolgte über einen Anti-His Antikörper, anschließender Inkubation mit einem Ziege Anti-Maus-HRP Antikörper und ECL. Abkürzungen: P: Peak; His markiertes lösliches humanes NKG2D (His₆solhNKG2D).

Die Größe des produzierten löslichen NKG2D stimmte hierbei mit der in Vector-NTI ermittelten Proteingröße überein. Da dem löslichen NKG2D die zytoplasmatische und die transmembrane Domäne fehlen, wick dessen Größe folglich von der des vollständigen

NKG2D-Proteins unter reduzierten Bedingungen (ca. 42 kDa) ab (Wu et al., 1999b; Pende et al., 2001).

Für die nachfolgende PEG-Biotinylierung wurde die P3-Fraktion aus der Gelfiltration verwendet. Hierzu wurde zunächst die Proteinmenge mit einem BCA Protein-Assay bestimmt.

Die anschließende Konjugation des His₆solhNKG2D-Proteins erfolgte mit einem vierfachen Überschuß an PEG-Biotin. Die Effizienz der Biotinylierung des NKG2D-Proteins konnte mit Hilfe eines Streptavidin-ELISA sichergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde ein weiteres Mal die Bindungsaktivität des NKG2D-Proteins nach dessen PEG-Biotinylierung am FACS auf BaF/3-Transfektanten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Somit lag ein biologisch aktives NKG2D vor, das aufgrund seiner Konjugation mit PEG-Biotin als Antigen im nachfolgenden Phagen-Display eingesetzt werden konnte.

4.2.3 Generierung eines NKG2D-spezifischen scFv durch Austausch der murinen VL gegen eine humane VL mit Hilfe des Phagen-Display

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die variable Region der leichten Kette für die Spezifität des Antikörpermoleküls eher eine untergeordnete Rolle spielt. Somit ist es möglich, durch Austausch der schweren Kette in Kombination mit ein und derselben leichten Kette unterschiedliche Antigen-spezifitäten zu erhalten (Sidhu et al., 2004). Behält man hingegen die schwere Kette bei und assoziiert diese mit verschiedenen leichten Ketten, so kann man sämtliche Antikörperkombinationen ein und derselben Spezifität generieren (Steinberger et al., 2000).

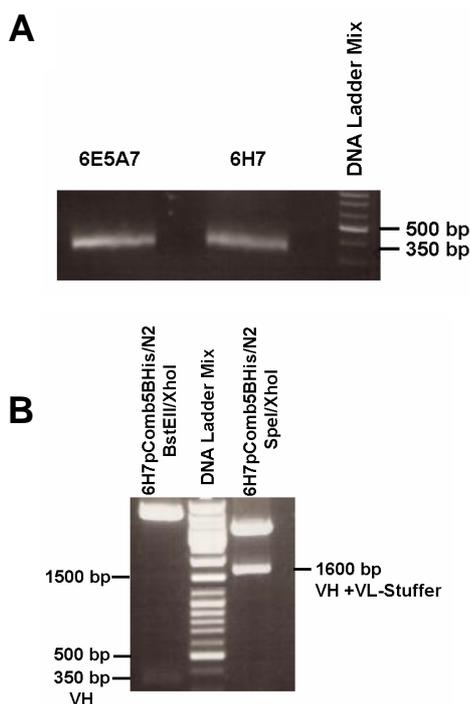


Abbildung 23: Klonierung der VH von 6H7 und 6E5A7 in den Phagen-Display-Vektor pComb5BHis/N2 zur Herstellung zweier Phagenbibliotheken . A Die VH Fragmente der murinen Antikörper 6H7 und 6E5A7 wurden über PCR aus den entsprechenden pEF-DHFR-Vektoren gewonnen, nach Verdau mit *XhoI* und *BstEII* gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden über Gelextraktion aufgereinigt. **B** Anschließend wurden die *XhoI/BstEII* geschnittenen VH-Fragmente und der Zielvektor pComb5BHis/N2 miteinander ligiert. Die Ligation wurde über den Kontrollverdau *XhoI/BstEII* und *SpeI/XhoI* im DNA-Gel überprüft. VL-Stuffer: Klonierungsstelle für die VL

Daher sollte in einem ersten Humanisierungsschritt zunächst die ursprüngliche murine VH-Kette mit einem Repertoire an verschiedenen humanen VL-Ketten kombiniert werden. Im Anschluß daran sollten die hNKG2D-bindenden VH-VL-Kombinationen mit Hilfe des Phagen-Display selektiert werden. Die VH-Regionen der beiden ursprünglichen Antikörper 6H7 und 6E5A7 wurden vorerst als sogenannte Leitstruktur für die Antigen-spezifität des Moleküls beibehalten (Guided Selection, Jespers et al., 1994).

Für die Selektion prokaryotisch exprimierter, hNKG2D-spezifischer Antikörperfragmente wurden zunächst zwei scFv-Bibliotheken erstellt. In einem ersten Schritt wurde die variable Region der schweren Ketten (VH) der parentalen murinen Antikörper 6H7 und 6E5A7 in den Phagemid-Vektor pComb5BHis/N2 subkloniert. Dies erfolgte nach PCR-Amplifikation einer entsprechenden DNA-Matrize mit den Primern 5'-6H7-VH-*XhoI* bzw. 5'-6E5-VH-*XhoI* und 3'-MuVH*BstEII* über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *BstEII* (Abb. 23A).

Eine erfolgreiche Ligation der VH-Fragmente in den Zielvektor konnte sowohl durch den Kontrollverdau mit *XhoI* und *BstEII* als auch durch den Verdau mit *SpeI* und *XhoI* sichergestellt werden. Durch den Verdau mit *XhoI* und *BstEII* wurde hierbei das VH-Fragment mit einer Größe von ca. 350 bp wieder aus dem Zielvektor ausgeschnitten. Bei einem Verdau mit *SpeI* und *XhoI* konnte die VH-Kette zusammen mit dem VL-Stuffer (ca. 1600 bp) wieder aus dem pComb5BHis/N2-Vektor entfernt werden (Abb. 23B).

Als humanes VL-Repertoire für die Kombination mit den parentalen VH-Fragmenten wurde ein humanes IgD-Repertoire verwendet, das bereits in Vorarbeiten (Arbeitsgruppe: Tobias Raum) aus peripheren B-Zellen fünf gesunder Spender generiert worden war. Das humane IgD-Repertoire zeichnet sich dadurch aus, dass es keine oder nur wenige somatische Hypermutationen besitzt und somit eine besondere Nähe zu den Keimbahngenen aufweist. Dies könnte folglich beim späteren Einsatz im Patienten eine geringere Immunogenizität gegen den therapeutischen Antikörper bewirken (Raum et al., 2001).

Für die Selektionsbibliotheken wurde ein VL-Pool gewählt, der sowohl aus kappa- als auch aus lambda-VL-Ketten bestand. Hierzu wurden zunächst die VL κ - und VL λ -Fragmente aus den pComb5BHis/N2-Vektoren unter Verwendung der Restriktionsenzyme *SacI* und *SpeI* heraus geschnitten, über Gelelektrophorese aufgetrennt, die 350 bp großen Fragmente aus dem Gel extrahiert und vereinigt (Abb. 24A). Der Pool aus gleichen Anteilen *SacI* und *SpeI* geschnittener VL κ - und VL λ -Fragmente wurde in die ebenso verdauten Phagemid-Vektoren pComb5BHis/N2 (Abb. 24B), die bereits die parentale VH-Region 6H7 oder 6E5A7 enthielten, ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue elektroporiert. Für die Diversität der so generierten scFv-Bibliotheken ist die Effizienz dieser Elektroporation absolut entscheidend.

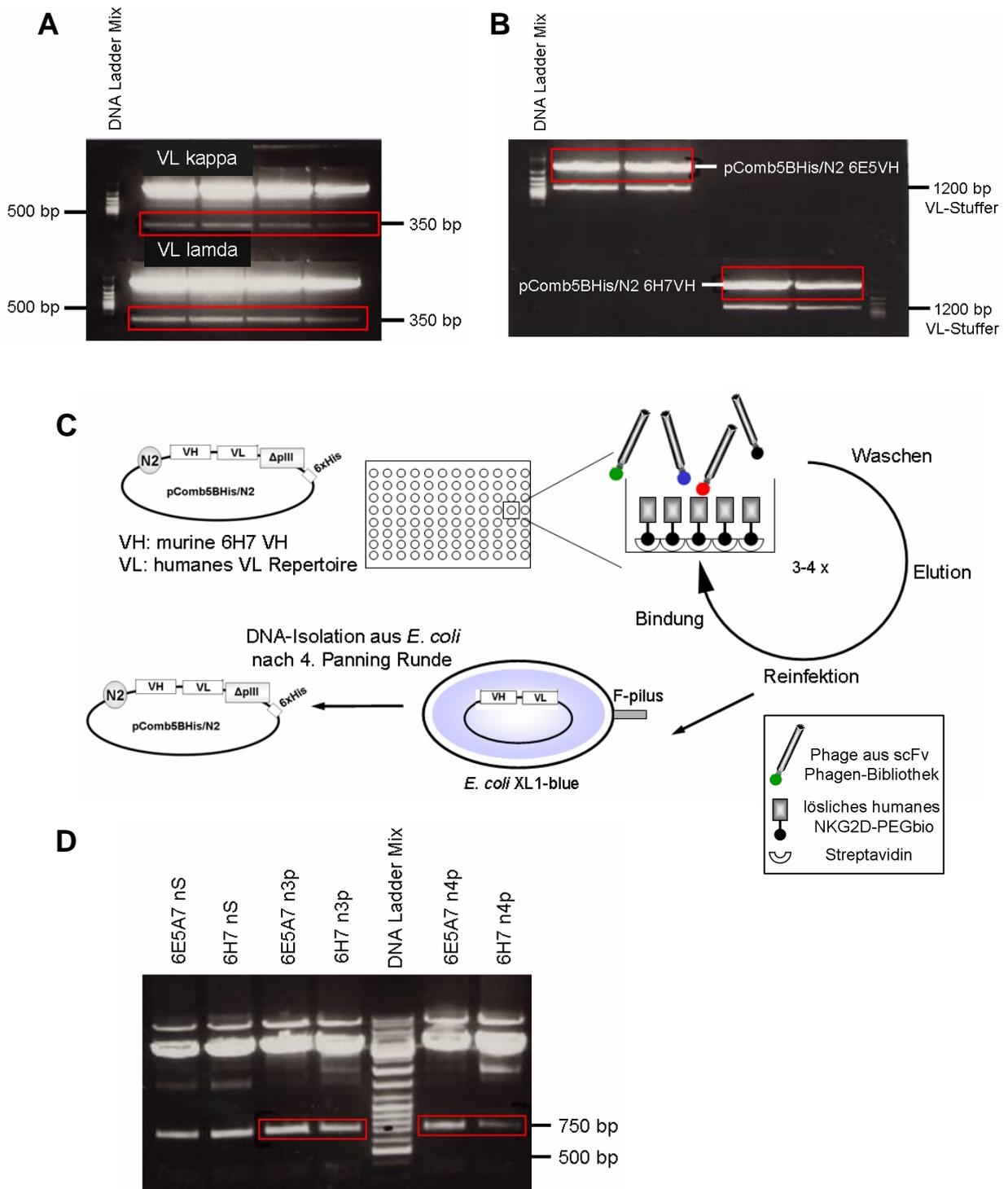


Abbildung 24: Herstellung der Phagenbibliotheken 6H7 bzw. 6E5A7 VH + human VL λ /k pComb5BHis/N2 und schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Humanisierung der VL der murinen scFv 6H7 und 6E5A7. **A** Zur Gewinnung der humanen VL λ /k wurden die VL-Fragmente über *SacI/SpeI* aus dem pComb5BHis/N2-Vektor ausgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden aus dem Gel extrahiert. **B** Die isolierten human VL λ /k-Fragmente wurden vereint und anschließend in die mit *SacI/SpeI* geschnittenen Vektoren pComb5BHis/N2 6H7VH bzw. 6E5A7VH ligiert. **C** Methode des Phagen-Display mit Selektion der antigenspezifischen scFv-Phagen über ein an eine Streptavidin-Platte immobilisiertes biotinyliertes humanes NKG2D (Platten-Panning). **D** Nach Durchführung des Phagen-Display für eine humane VL wurde die DNA der zwei Phagenbibliotheken 6H7VH+ human VL λ /k-Pool und 6E5A7VH + human VL λ /k-Pool aus den einzelnen Panning-Schritten aufgereinigt und anschließend durch einen Restriktionsverdau mit *XhoI* und *SpeI* auf das Vorhandensein von scFv-Fragmenten untersucht. Abkürzungen: nS: nach Schuß bzw. Elektroporation; n3p-4p: nach 3.-4. Panning.

Die Anzahl unabhängiger Bakterienklone gilt hierbei als Maß für die Diversität. Diese wurde ermittelt, indem der Bakterienkultur nach der Elektroporation ein kleines Aliquot entnommen und auf Selektionsmedium ausplattiert wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Einzelkolonien ausgezählt und auf das Gesamt-Kulturvolumen umgerechnet. Die Zahl unabhängiger Klone dieser beiden kombinatorischen Bibliotheken aus parentaler VH-Kette und humanem $V_{\kappa/\lambda}$ -Pool lag ungefähr bei $2,4x$ und $2,7x 10^8$.

Im Anschluß an die Elektroporation wurde die *E. coli* XL1-Blue-Kultur mit den Helferphagen *VCSM13* infiziert, welche die Produktion und Freisetzung der scFv-tragenden Phagen durch die Bakterien im Kulturmedium bewirkten. Die scFv-Fragmente wurden dabei in Fusion mit einem Teil des Phagenhüllproteins pIII (Δ pIII) am Phagencapsid exprimiert.

Nach einer Amplifikationsphase über Nacht wurden die Phagen aus dem Kulturmedium gefällt. Mit einem Teil der Phagenlösung wurde der Phagentiter (*input*) bestimmt. Die restliche Phagenlösung wurde in die Selektion eingesetzt. Als Selektionsmethode wurde das Platten-Panning gewählt, bei der die scFv-tragenden Phagen mit einem auf einer Streptavidin-Platte immobilisierten, PEG-biotinyliertem Antigen inkubiert werden (Abb. 24C). Nach Ablauf der Inkubationszeit scFv-tragender Phagen mit dem PEGbio-hNKG2D wurde die Phagenlösung wieder abgenommen und unspezifisch gebundene Phagen durch mehrere nacheinander folgende Waschschriffe entfernt. Danach wurde die spezifische Bindung von scFv-Phagen an das Antigen durch Herabsetzen des pH-Wertes gelöst und dabei die antigenspezifischen scFv-tragenden Phagen eluiert. Das neutralisierte Phageneluat wurde schließlich zur Reinfektion einer frischen *E. coli* XL1-Blue-Kultur verwendet.

Zur Bestimmung der Anzahl infizierter Bakterienzellen als Maß des Phagentiters nach der Selektion (*output*) wurde nach der Reinfektion ein kleines Aliquot entnommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Der Output-Phagentiter entspricht hierbei der Gesamtzahl der in dieser Runde selektierten Phagen.

Im Anschluss an die Reinfektion wurden die scFv-tragenden Phagen wiederum mit Hilfe von *VCSM13*-Helferphagen exprimiert und amplifiziert, dann geerntet, gefällt, mit Antigen inkubiert und wie oben beschrieben weiter verfahren. Durch diesen sich wiederholenden Selektionszyklus wird in jeder Runde der Anteil an antigenbindenden Phagen erhöht und es können somit spezifische Binder angereichert werden (Abb. 24C).

Nach Abschluss der Selektion wurden die Plasmide der Phagen produzierenden *E. coli*-Kulturen aus der Amplifikationsphase der dritten und vierten Selektionsrunde isoliert. In diesem Pool aus pComb5BHis/N2-Plasmiden war die Gesamtheit der genetischen Information der bis zu diesem Zeitpunkt selektierten scFv enthalten.

Um einzelne, spezifisch bindende scFv zu identifizieren, wurden die für die scFv kodierenden DNA-Fragmente aus dem Plasmidpool über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SpeI* ausgeschnitten (Abb. 24D) und in einen entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pComb5BF/HdeIN2 ligiert (Abb. 25A).

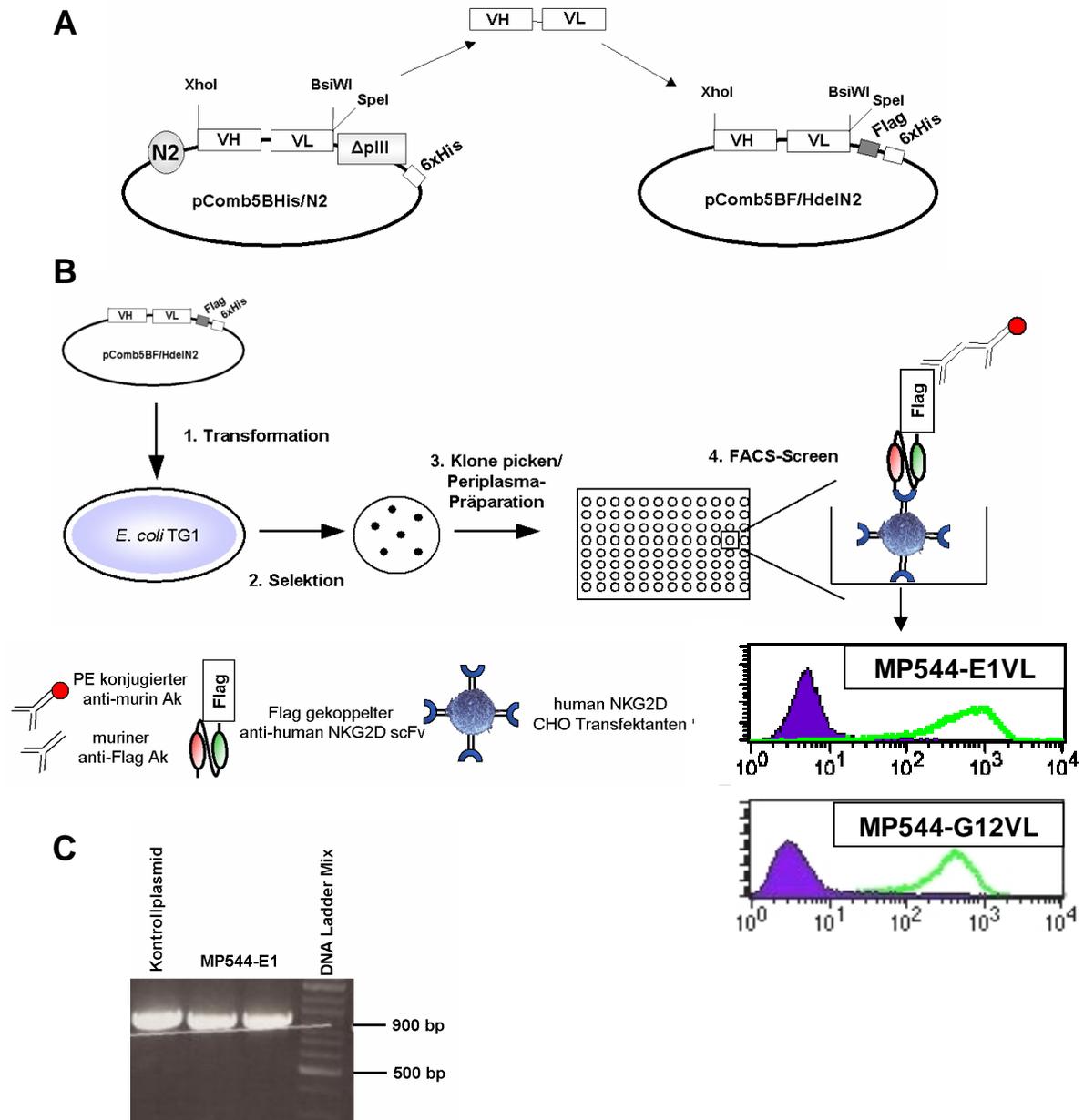


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Selektion einer humanen VL. **A** Umklonierung des scFv vom Phagen-Display-Vektor pComb5BHis/N2 mittels Restriktionsverdau mit *XhoI* und *SpeI* in den Screening-Vektor pComb5BF/HdeIN2. **B** Nach Umklonierung des scFv-Pools (murine VH und humane VL) aus dem Phagen-Display-Vektor in den Screening-Vektor und anschließender Transformation in TG1 Bakterienzellen wurden die Periplasmaüberstände wachsender Klone im FACS auf NKG2D-bindende scFv untersucht. FACS-Histogramme der Binder hE1VL bzw. hG12VL 6H7mVH (Abb. rechts unten). Die Detektion der scFv erfolgte über einen murinen anti-FLAG Antikörper (M2, Sigma) und anschließender Inkubation mit einem PE-konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper. Negativkontrolle (lila), Bindung des scFv (grün). **C** Das Vorhandensein des scFv-Fragmentes in pComb5BF/HdeIN2 wurde mittels PCR mit den Primern 5'-upEco und 3'-downPIII überprüft und ist hier exemplarisch für hE1VL 6H7mVH dargestellt.

Dieser Vektor erlaubte die periplasmatische Expression der scFv ohne Koppelung an das Phagen-Gen III (Abb. 25A). Die scFv wurden dabei als FLAG- und Hexa-Histidin-Fusionsproteine exprimiert. Diese Markierungssequenzen sollten später den Nachweis und die Aufreinigung des Proteins ermöglichen. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* TG1 wurden Einzelkolonien gepickt, die nun jeweils ein bestimmtes scFv-kodierendes Plasmid trugen. Diese Einzelkolonien wurden in einer 96-well Platte in 100 µl Flüssigkulturen angezogen. Nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG und Übernachtskultur bei 30°C wurde eine Periplasmapräparation durchgeführt. Um Klone zu identifizieren, die einen löslichen, hNKG2D-spezifischen scFv produzierten, wurden diese Periplasmapräparationen am FACS auf Bindung an membranständiges hNKG2D getestet (Abb. 25B). Auf diese Weise wurden mehrere hundert Klone der beiden scFv-Bibliotheken untersucht.

Für lediglich zwei Klone, MP544-E1 und MP544-G12, konnte eine relativ gute Bindung auf CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Zellen am FACS festgestellt werden (Abb. 25B). Beide Klone stammten aus der scFv-Bibliothek mit der parentalen VH des murinen 6H7-scFv. Bei diesen positiven Klonen konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Kombination der selektierten humanen V_κ- oder V_λ- leichten Kette mit der parentalen VH-Kette im Phagen-Display ein löslich produzierbarer, hNKG2D-spezifischer scFv generiert worden war.

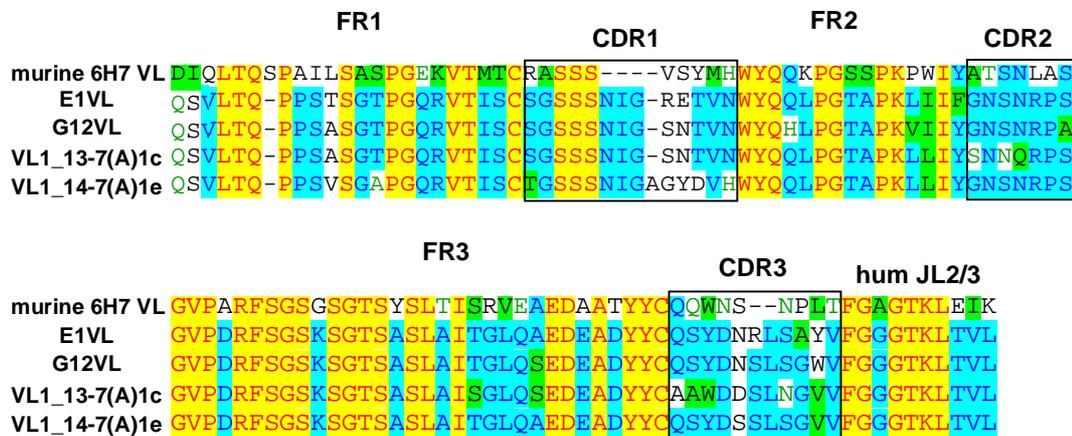


Abbildung 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen der selektierten humanen VL-Ketten. Die mit Hilfe des Phagen-Display selektierten Klone E1 und G12 wurden mit der murinen 6H7 VL und den nächstverwandten humanen Keimbahnsequenzen VL1_13-7(A)1c und VL1_14-7(A)1e mittels Vector NTI Software verglichen.

Zusätzlich wurde eine Screening-PCR, nach Mini-Präparation der beiden Klone und Retransformation in *E. coli*, mit den beiden Primern 5'-upEco und 3'-downPIII durchgeführt, um die Integration des scFv im pComb5BF/HdeIN2 nachzuweisen (Abb. 25C). Schließlich wurde die DNA-Sequenz der beiden Klone bestimmt und festgestellt, dass es sich um unterschiedliche Sequenzen handelt. Bei einem anschließenden

Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den in der V-Base-Datenbank erfassten humanen Keimbahnsequenzen stellte sich heraus, dass es sich sowohl bei der E1-VL als auch bei der G12-VL um V λ -Ketten handelte. Beide schienen hierbei in den Regionen von FR1, CDR1 und FR2 am nächsten mit dem Keimbahnsegment VL1_13-7(A)1c, in den Regionen CDR2 und FR3 mit VL1_14-7(A)1e und in der Region JL mit JL2/3 verwandt zu sein (Abb. 26). Die Aminosäuresequenz der E1VL weicht sowohl in den Framework-Regionen als auch in den CDR-Regionen an fünf Positionen von der Keimbahnsequenz VL1_13-7(A)1c ab (ca. 89% Identität). Die CDR3-Region wurde aufgrund der hohen Variabilität bei der Bestimmung der Identität nicht berücksichtigt. Mit Hilfe des Phagen-Display konnten somit zwar zu der murinen 6H7-VH, jedoch nicht zu der 6E5A7-VH passende humane VL-Ketten gefunden werden. Für die weitere Humanisierung des 6H7 scFv wurde nun sowohl die humane E1VL als auch die humane G12VL als Leitstruktur im Phagen-Display verwendet.

4.2.4 Schrittweise Humanisierung der VH

Für die Herstellung eines vollständig humanisierten scFv musste nun zu den humanen E1VL bzw. G12VL eine passende humane VH-Kette gefunden werden, die mittels Phagen-Display aus einem humanen VH-Repertoire selektiert werden sollte.

Im Gegensatz zur leichten Kette ist die variable Region der schweren Kette bekanntermaßen deutlich stärker an der Antigenbindung beteiligt (Kabat & Wu, 1991). Besonders der hochvariable CDR3-Bereich der VH-Kette spielt eine wichtige Rolle bei der exakten Bindung an ein bestimmtes Epitop des Antigens. Demnach ist es möglich, dass eine Veränderung im CDR3-Bereich alleine ausreicht, um die Antikörperspezifität zu verändern (Xu & Davis, 2000). Aufgrund dieser Tatsache wurde die CDR3-Region der parentalen 6H7 VH-Kette in eine humane VH-Bibliothek integriert, um beim Phagen-Display in Kombination mit der humanen E1VL bzw. G12VL die Epitopspezifität beizubehalten.

Letztendlich konnte jedoch über die Phagen-Display-Technologie keine passende humane VH gefunden werden (Abb. 27A), so dass die parentale VH schrittweise in eine humane Aminosäuresequenz überführt werden musste. Da es sich bei einer schrittweisen Humanisierung um einen sehr aufwendigen Prozess handelt, wurde dies nur für die Kombination mit der humanen E1VL durchgeführt, da dieser scFv eine stärkere Färbung von NKG2D-exprimierenden Zellen zeigte (Abb. 25B).

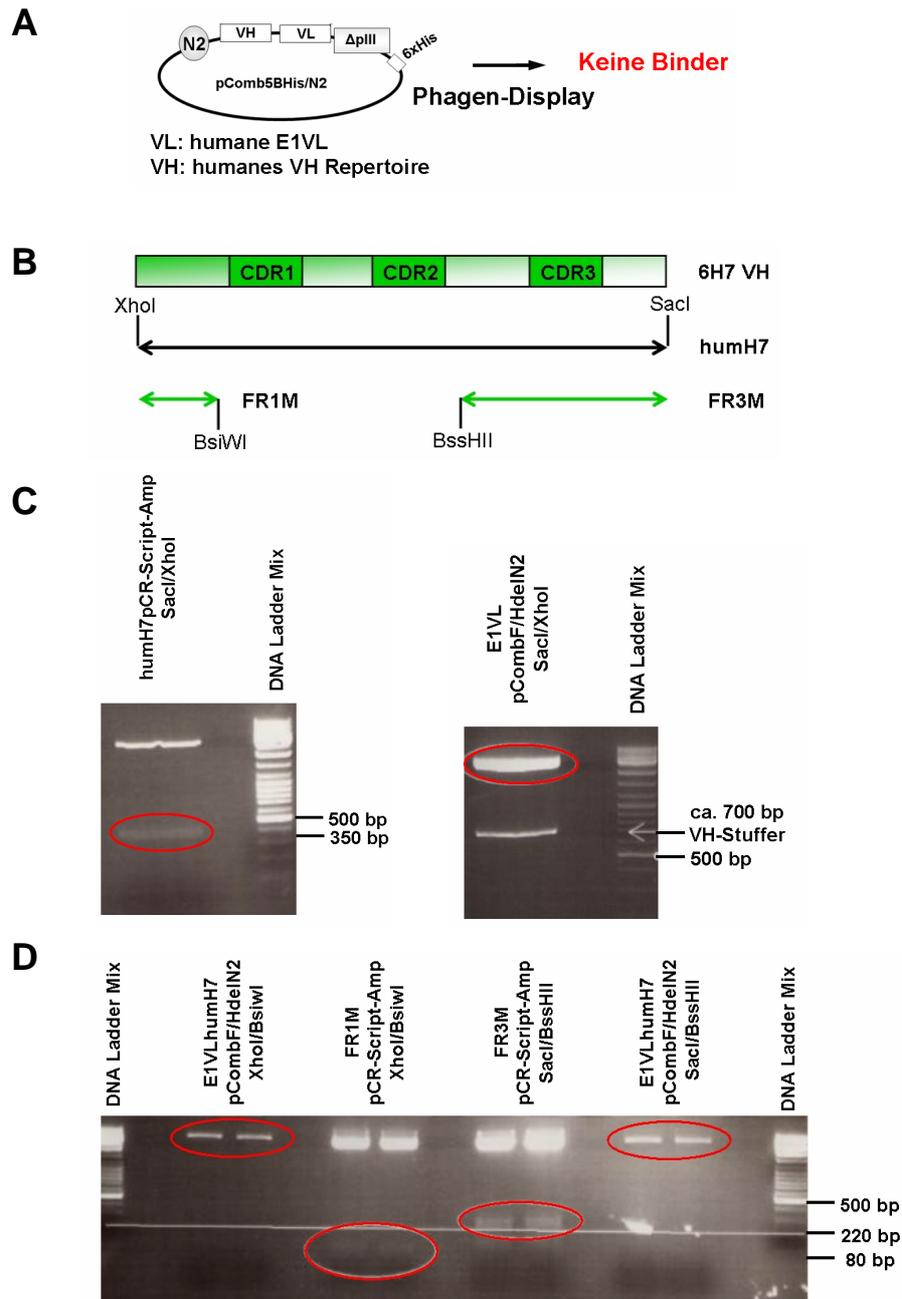
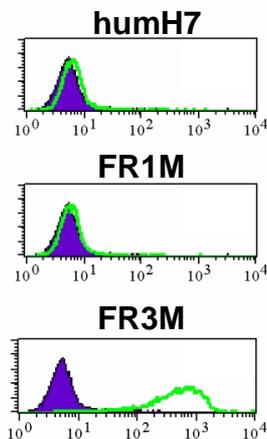


Abbildung 27: Humanisierung der VH des murinen 6H7 scFv mittels synthetischer Herstellung humaner Frameworks I-III (FRI-III). A Da mit Hilfe der Phagen-Display-Methode mit der Phagenbibliothek E1VL+humanes VH Repertoire in pComb5BHis/N2 keine NG2D-bindenden scFv selektiert werden konnten, sollte die VH über synthetisch hergestellte humane Fragmente gewonnen werden. B Von der Firma Entelechon wurden 3 Fragmente (humH7, FR1M und FR3M in einem pCR-Script-Amp^r-Vektor) synthetisch hergestellt. C Das Fragment humH7 wurde über *SacI/XhoI* in den ebenfalls geschnittenen E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor kloniert. D Das Fragment FR1M (ca. 80 bp) wurde über *XhoI/BsiWI* und das Fragment FR3M (ca. 220 bp) über *SacI/BssHII* in die jeweiligen Vektoren E1VLhumH7pComb5BF/HdeIN2 eingefügt, so dass drei verschiedene Konstrukte entstanden: E1VLhumH7pComb5BF/HdeIN2 (HHH), E1VLhumH7FR1MpComb5BF/HdeIN2 (MHH) und E1VLhumH7FR3MpComb5BF/HdeIN2 (HHM). M: murin, H: human, VH-Stuffer: Klonierungsstelle für die VH.

Ausgehend von der parentalen VH-Kette des 6H7 scFv wurden drei unterschiedlich stark humanisierte VH-Sequenzen entworfen. Diese wurden synthetisch von der Firma Entelechon hergestellt und in einen pCR-Script-Amp-Vektor integriert (Abb. 27B). Das

sogenannte Fragment „humH7“ besaß in FR1-FR3 humane Sequenzen (HHH). Lediglich die CDR-Bereiche blieben zur Erhaltung der Epitopspezifität murin. Es wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* aus dem pCR-Sript-Vektor ausgeschnitten (Abb. 27C, linkes DNA-Gel) und anschließend mit dem ebenso geschnittenen E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor (Abb. 27C, rechtes DNA-Gel) ligiert.

Das Fragment FR1M (ca. 80 bp) konnte mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *BsiWI* in das humH7-Segment kloniert werden (Abb. 27B/D). In Folge dieses Klonierungsschrittes konnte eine VH-Kette mit einem murinen FR1- und humanen FR2- und FR3-Bereichen (MHH) geschaffen werden. Das Fragment FR3M (ca. 220 bp) wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *BssHII* in das humH7-Segment eingefügt (Abb. 27B/D), so dass eine schwere Kette mit humaner FR1- und FR2- und muriner FR3-Region entstand. Durch die Ligation der verschiedenen Fragmente mit den entsprechenden Vektoren wurden demnach die drei unterschiedlichen Konstrukte HHH, MHH und HMM generiert. Diese wurden zur Herstellung von periplasmatischen Aufschlüssen in TG1-Zellen transformiert und die Bindung der unterschiedlich stark humanisierten Anti-hNKG2D scFv auf NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺ CHO-Zellen am FACS getestet (Abb. 28).



	FR I	II	III
humH7	H	H	H
FR1M	M	H	H
FR3M	H	H	M

Abbildung 28: Bindungsaktivität der synthetisch hergestellten humanen Frameworks FRI-III. Die Bindungseigenschaft der in den FRI-III unterschiedlich stark humanisierten Fragmente wurde am FACS auf NKG2D positiven Zellen getestet (FACS-Histogramme; linke Abb.). Negativkontrolle (lila, gefüllt) und Bindung des scFv (grün, ungefüllt). H: human; M: murin

Anhand der Bindungsstudien am FACS konnte gezeigt werden, dass FR3 maßgeblich am Erhalt der Bindungsfähigkeit der scFv beteiligt zu sein scheint, da eine Humanisierung dieser Region zum sofortigen Verlust der Bindung des scFv führte (Abb. 28). Somit war eine vollständige Humanisierung des FR3 nicht ohne weiteres möglich und musste schrittweise vollzogen werden. Anhand der Untersuchung der Proteinsequenz und mit Hilfe von Strukturanalysen des Konstruktes in Vector NTI wurden daher scheinbar kritische Aminosäuren murinen Ursprungs ermittelt. Die daraus gewonnenen Informationen wurden für die Entwicklung unterschiedlich stark humanisierter Konstrukte verwendet. Die Effekte der einzelnen Humanisierungsschritte auf die Aktivität des scFv wurden anschließend direkt in Bindungsstudien untersucht.

Für die folgenden Humanisierungsschritte innerhalb des FR3 wurden weitere vier verschiedene synthetische Konstrukte, die in unterschiedlichen Bereichen des FR3 murinen Ursprungs waren, von Entelechon hergestellt (H6A, H6B, H6C und H6D in pCR-4TOPO) (Abb. 29B). Diese wurden mit *SacI* und *BssHII* in den E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor umklontiert (Abb. 29A). Zusätzlich wurden in insgesamt fünf unterschiedlichen Positionen von FR1, FR2 und FR3 Einzelmutationen eingefügt (Abb. 29B).

Diese neun Konstrukte wurden zur Herstellung von periplasmatischen Aufschlüssen wiederum in TG1-Zellen transformiert und deren Bindungsaktivität auf NKG2D-positiven CHO-Zellen am FACS untersucht (Abb. 29C).

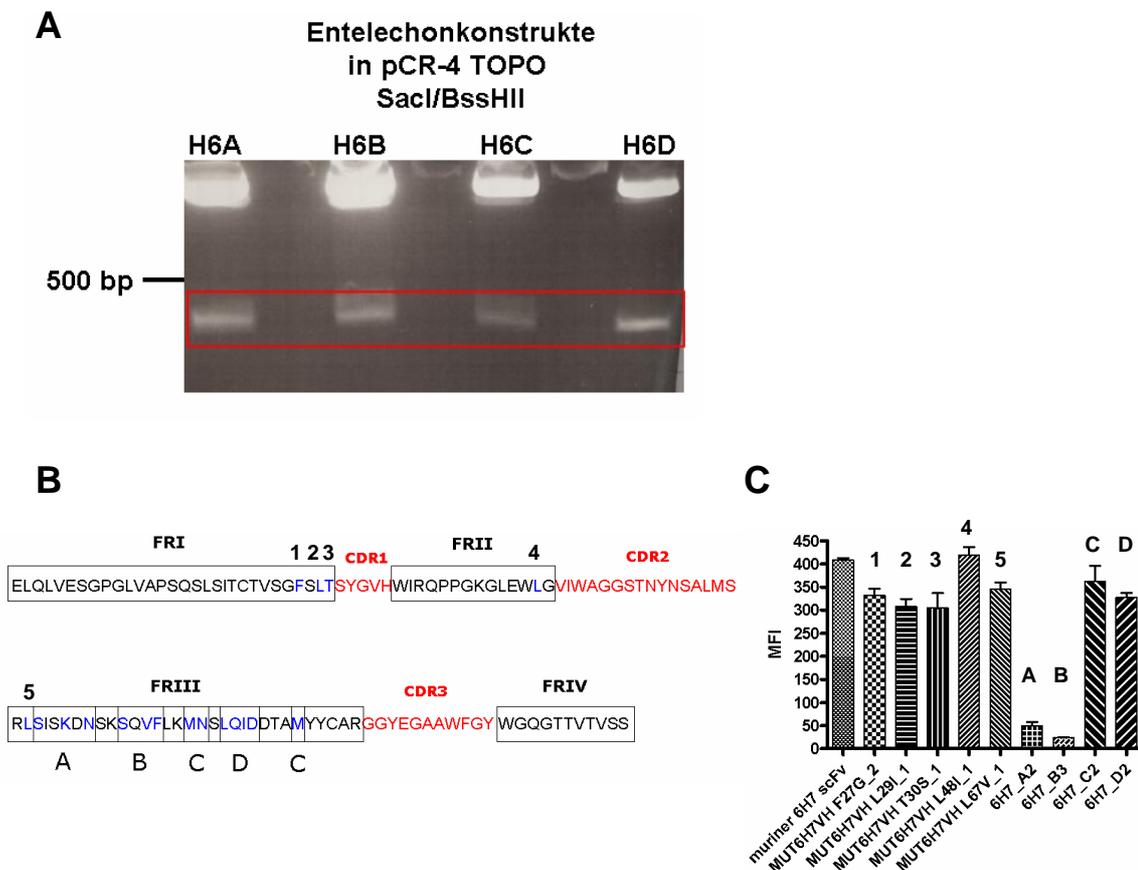


Abbildung 29: Schrittweise Mutation und Humanisierung der VH des murinen scFv 6H7 und Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften der einzelnen Mutanten. **A** Für die weitere schrittweise Humanisierung des FRIII wurden vier verschiedene synthetische Konstrukte von Entelechon hergestellt (H6A, H6B, H6C und H6D in pCR-4TOPO). Diese wurden über *SacI/BssHII* in den E1VLpComb5BF/HdeIN2 Vektor umklontiert. **B** Die Abbildung zeigt die Sequenz der humH7FR3MVH eingeteilt in die unterschiedlichen Bereiche CDR1-3 und FRI-III. Die Stellen, an denen Mutationen von murin nach human erfolgten sind durch blaue Buchstaben gekennzeichnet. Im FRIII wurden hierbei ganze Bereiche A, B, C und D (Entelechonkonstrukte H6A-D) mutiert. **C** Die Bindungsaktivität der einzelnen mutierten scFv wurde schließlich mittels FACS auf NKG2D positiven Zellen getestet. Die Messung der MFI (Mean Fluorescence Intensity) erfolgte jeweils in Triplikaten. Im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Während die Einzelmutationen und die Humanisierung in den Bereichen C und D des FR3 keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des scFv zu nehmen schien, führte eine Veränderung in den FR3-Regionen A und B hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Bindungsaktivität des scFv (Abb. 29C).

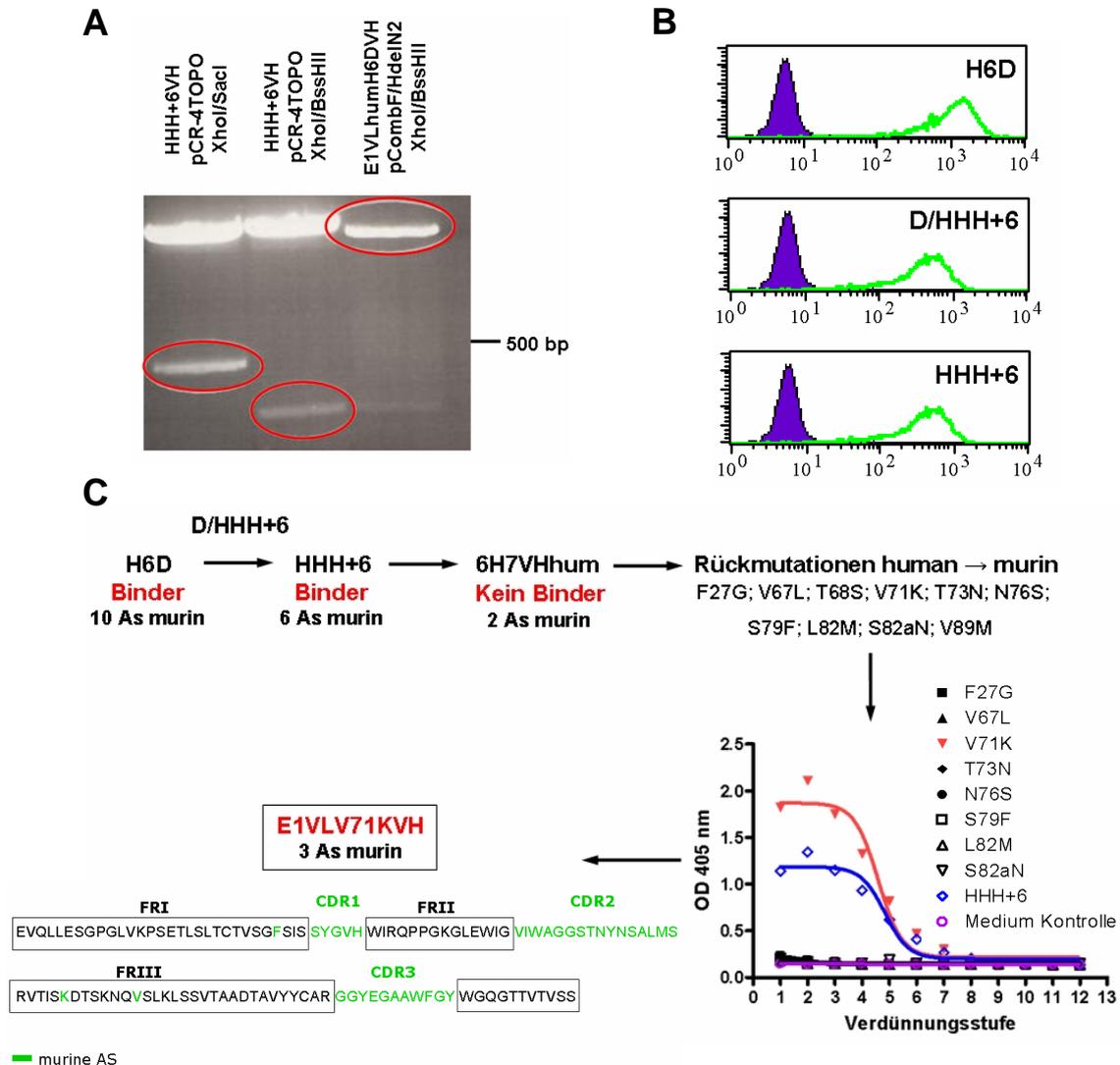


Abbildung 30: Schrittweise Annäherung an eine optimale Humanisierung der VH des murinen scFv 6H7. **A** Anhand der FACS-Daten der drei Konstrukte humH7, humH7FR1M und humH7FR3M wurde ein weiteres Konstrukt HHH+6 (in pCR-4TOPO-Vektor) von Entelechon synthetisch hergestellt und über *XhoI/SacI* in den E1VLpComb5BF/HdeIIN2-Vektor (HHH+6) bzw. über *XhoI/BssHII* in E1VLhumH6DpComb5BF/HdeIIN2-Vektor (D/HHH+6) umklontiert. **B** Die Bindungseigenschaft der Konstrukte wurde im FACS auf NKG2D positiven Zellen getestet (FACS-Histogramme; Abb. rechts oben). Negativkontrolle (lila, gefüllt) und Bindung des scFv (grün, ungefüllt). **C** Durch das Einfügen weiterer Mutationen wurde versucht, die Anzahl an Aminosäuren (As) murinen Ursprungs stetig zu verringern. Eine mit der Software Vector NTI ermittelte humane Sequenz mit nur 2 ursprünglich murinen As, die synthetisch hergestellt wurde (6H7VHhum), verlor jedoch vollständig ihre Bindungsaktivität. Durch Rückführung einzelner As von human nach murin wurde versucht die Bindungsaktivität wieder herzustellen. Die Bindungseigenschaften der einzelnen Rückmutationen wurden in einem Streptavidin-ELISA auf biotinyliertem NKG2D getestet (s. Abb. rechts unten). Die Mutation V zu K an der Position 71 konnte die Bindungsaktivität wieder herstellen.

Anhand der aus den Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse wurde ein weiteres Konstrukt HHH+6 (in pCR-4TOPO-Vektor) von Entelechon synthetisch hergestellt. Die

Proteinsequenz dieses Moleküls basiert hierbei auf der des „humH7“ bzw. HHH mit dem Unterschied, dass in den Abschnitten A und B des FR3 insgesamt sechs Aminosäuren zu ursprünglich murinen Aminosäuren rückkonvertiert wurden. Das Konstrukt wurde mit *XhoI* und *SacI* in den E1VLpComb5BF/HdeIN2-Vektor (HHH+6) oder mit *XhoI* und *BssHII* in den E1VLhumH6DpComb5BF/HdeIN2-Vektor (D/HHH+6) kloniert (Abb. 30A). Die VH-Kette des D/HHH+6 Moleküls enthält hierbei von FR1 bis zum CDR2 die Proteinsequenz des HHH+6- und ab dem FR3 die Sequenz des H6D-Konstruktes.

Die Bindungseigenschaft der beiden Konstrukte HHH+6 und D/HHH+6 wurde anschließend ebenfalls am FACS auf NKG2D-positiven Zellen analysiert. Hierbei diente das Konstrukt H6D als Referenz-scFv. Sowohl der HHH+6- als auch der D/HHH+6-scFv waren dazu in der Lage, membrangebundenes NKG2D zu erkennen und zu binden (Abb. 30B).

Durch das Einfügen weiterer Mutationen mittels PCR und Oligonukleotid-Primern an bestimmten Stellen im FR1, 2 und 3 wurde versucht, die Anzahl an Aminosäuren murinen Ursprungs stetig zu verringern.

Eine mit der Software Vector NTI ermittelte humane Sequenz mit zwei restlichen Aminosäuren murinen Ursprungs, die synthetisch hergestellt wurde (6H7VHhum), verlor jedoch vollständig ihre Bindungsaktivität (Abb. 30C). Durch die Rückführung einzelner humaner Aminosäuren zu einem murinen Ursprung mittels PCR wurde versucht, die Bindungsaktivität wieder herzustellen. Die Bindungseigenschaften der einzelnen Rückmutationen wurden in einem Streptavidin-ELISA auf biotinyliertem NKG2D untersucht. Über den Austausch einer einzigen Aminosäure von V zu K an Position 71 konnte schließlich die Bindungsaktivität des scFv wieder hergestellt werden (Abb. 30C). Somit konnte das finale Konstrukt E1VLV71KVH mit lediglich drei restlichen Aminosäuren murinen Ursprungs in den FR-Regionen der VH identifiziert werden (Abb. 30C).

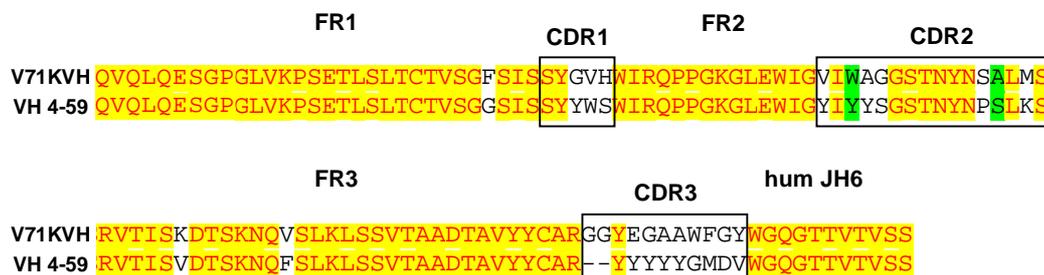


Abbildung 31: Vergleich der Aminosäuresequenz der humanisierten V71KVH-Kette. Die mit Hilfe schrittweiser Humanisierung ermittelte V71KVH-Sequenz wurde mit der nächstverwandten Keimbahnsequenz VH 4-59 mittels Vector NTI Software verglichen.

Mit Hilfe eines anschließenden Vergleichs der Aminosäuresequenz der V71KVH mit in der V-Base-Datenbank erfassten humanen VH-Keimbahnsequenzen konnte die humane VH 4-59 als nächstverwandte Sequenz (88% Identität) ermittelt werden (Abb.

31). Dieser scFv sollte nun in ein vollständiges humanes Antikörperformat überführt, in einem eukaryotischen System produziert, anschließend aufgereinigt und charakterisiert werden. Aufgrund der humanen VL und einer nahezu vollständig humanen VH wird das Konstrukt E1VLV71KVH in den folgenden Abschnitten als human IgG1 bezeichnet.

4.2.5 Produktion und Charakterisierung eines humanen Anti-hNKG2D Antikörpers

ScFv-Fragmente sind um ein sechstel kleiner als Immunglobuline. Ihre geringe Größe kann für viele Anwendungen ein entscheidender Vorteil sein. Allerdings verfügen scFv-Fragmente über eine vergleichsweise geringe Halbwertszeit im Körper und werden innerhalb weniger Stunden eliminiert (Carter, 2006; Schrama et al., 2006a). Humane Antikörper hingegen haben im menschlichen Organismus Halbwertszeiten von bis zu drei Wochen. Um diese potentiell therapeutisch relevante längere Verweildauer zu nutzen, sollte der humanisierte Anti-hNKG2D-scFv in das humane IgG1 Antikörperformat konvertiert werden. Die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften dieses ganzen Antikörpers sollten anschließend in Zytotoxizitätsstudien untersucht werden.

4.2.5.1 Klonierung und Produktion des E1VLV71KVH als vollständigen IgG1 Antikörper

Zur Produktion ganzer humaner IgG1 Antikörper in eukaryotischen Zellen wurden die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette des humanisierten scFv in die Expressionsvektoren pEF-DHFR und pEF-ADA kloniert (Abb. 32).

Hierzu wurde bei der humanisierten V71KVH mittels PCR am 5'-Ende eine *Bsu36I*-Schnittstelle angehängt. Das *Bsu36I*-verdauten PCR-Produkt wurde anschließend in einen ebenso verdauten pEF-DHFR-Vektor eingebracht. Die konstanten Domänen CH1, CH2 und CH3 wurden aus einem bereits vorhandenen humanen IgG1-Konstrukt über einen *XbaI*-Verdau eingefügt.

Die Umklonierung der humanen E1VL wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die humane VL-Region bei gleichzeitiger Deletion einer internen *Bsu36I*-Schnittstelle amplifiziert. Hierzu wurde zunächst mittels PCR und spezieller Primer auf einem humanen VH-Template ein sogenannter 5'-Megaprimers hergestellt.

Mit Hilfe dieses 5'-Megaprimers und einem 3'-A240 overlap Primer wurde die humane VL aus dem pComb5BF/H/deIN2-Vektor amplifiziert. In einer weiteren PCR-Reaktion wurde auf einem bereits vorhandenen Konstrukt der humane konstante C λ -Teil gewonnen. Über eine Fusions-PCR wurde schließlich die variable VL-Domäne mit dem konstanten C λ -Teil fusioniert, über *Bsu36I* und *NotI* in einen Übergangsvektor subkloniert und anschließend über *EcoRI* und *Sall* in einen pEF-ADA-Vektor kloniert. Die beiden

Expressionsvektoren und die darin enthaltenen Konstrukte wurden sequenziert und die Sequenz mittels Vector NTI auf ihre Richtigkeit überprüft.

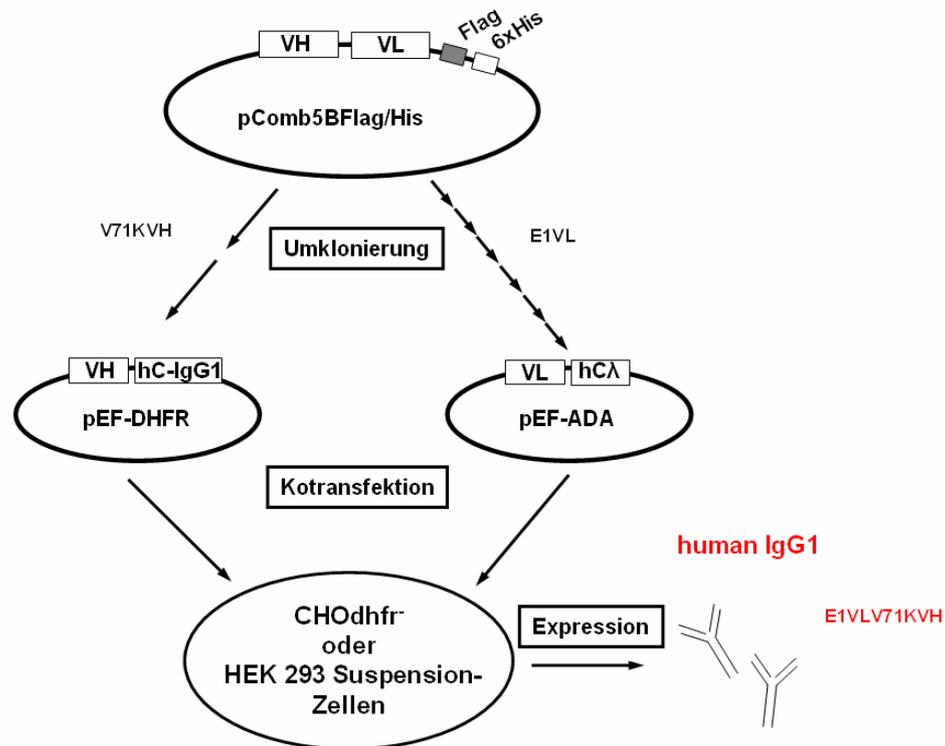


Abbildung 32: Klonierung und Expression des humanen IgG1 Antikörpers E1VLV71KVH. Ausgehend vom scFv-Konstrukt E1VLV71KVH im Screening-Vektor pComb5BFLAG/His wurden die VH- und die VL-Ketten zunächst einzeln in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEF-ADA und pEF-DHFR umkloniert. Hierbei wurde die V71KVH mit dem humanen konstanten IgG1 Fragment und die E1VL mit dem konstanten humanen lamda Fragment fusioniert. Durch die Kotransfektion beider eukaryotischer Expressionsvektoren in CHO-dhfr⁻ - oder HEK293 Suspensions-Zellen erfolgte die Produktion des humanen E1VLV71KVH IgG1 Antikörpers.

Zur Expression vollständiger Antikörpermoleküle wurden beide Expressionsplasmide entweder transient in HEK 293-F Suspensions-Zellen oder stabil in CHO-dhfr⁻-Zellen transfiziert. Diese Kotransfektion resultierte in der Expression von vollständigen Antikörpermolekülen, die in den Kulturüberstand abgegeben wurden (Abb. 32). Aus den Zellkulturüberständen wurde der IgG E1VLV71KVH affinitätschromatographisch über eine Protein-G Säule in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Patrick Hoffmann (Micromet AG) aufgereinigt (Abb. 33A). Mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Färbung des Gels mit Coomassie (Abb. 33B) konnte die Reinheit des Antikörpermoleküls festgestellt werden.

Eine Bindung des Antikörpers und seine Fähigkeit zur Neutralisierung einer Bindung von PEG-biotinyliertem ULBP-2Fc konnte nach der erfolgten Aufreinigung auf CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 33C). Anschließend sollte die biologische Aktivität dieses E1VLV71KVH-Antikörpers, d.h. seine Fähigkeit zur Inhibierung oder Aktivierung, in den folgenden Zytotoxizitätsstudien untersucht werden.

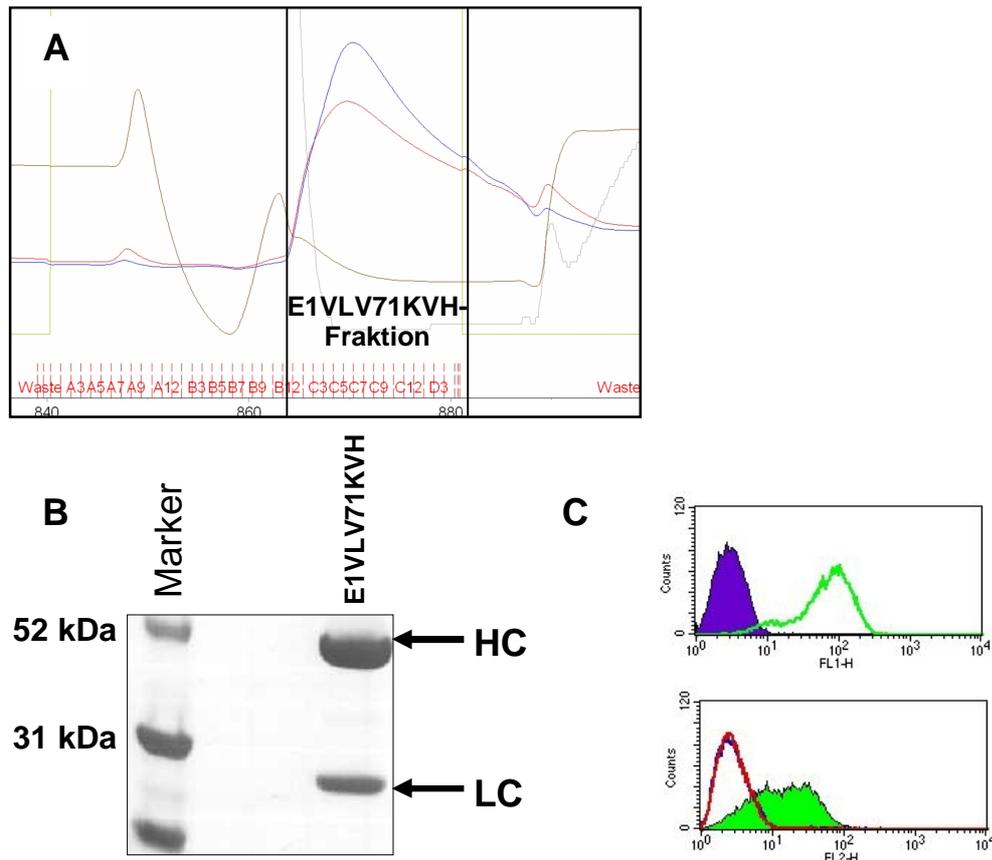


Abbildung 33: Aufreinigung des humanen E1VLV71KVH IgG1 Antikörpers über eine Protein G Säule. Nach Produktion des E1VLV71KVH Antikörpers durch stabile CHO-Transfektanten wurde der Antikörper über eine Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Zur Kontrolle der Reinheit wurde der aufgereinigte Antikörper mittels SDS-Page aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. **A** Chromatogramm der Aufreinigung des Antikörpers über Protein G. **B** Coomassie-Gel nach Aufreinigung des Antikörpers. **C** Bindung des E1VLV71KVH an CHO-NKG2D⁺/DAP10⁺-Zellen (oberes Histogramm, lila: Isotyp-Kontrolle, grün: Bindung E1VLV71KVH); Konkurrenz der ULBP-2FcPEGbio Bindung an CHO-NKG2D⁺/DAP10⁺-Zellen durch den Einsatz des E1VLV71KVH (unteres Histogramm, grün: ULBP-2FcPEGbio Bindung, blau: CD25FcPEGbio Bindung, rot: Konkurrenz der Liganden-Bindung durch Einsatz des E1VLV71KVH. Abkürzungen: HC: Heavy Chain; LC: Light Chain.

4.2.5.2 Der humane E1VLV71KVH-Antikörper besitzt verringerte antagonistische Fähigkeiten im ⁵¹Cr-Freisetzung-Assay

Infolge des Phagen-Displays und der einzelnen Humanisierungsschritte können bei einem Antikörper sowohl Veränderungen in der Epitop-Erkennung als auch in der Bindungsaktivität an das Antigen auftreten. Daher sollte der Antikörper E1VLV71KVH nach erfolgter Humanisierung zur Überprüfung seiner biologischen Effektivität in den beiden *in vitro* Systemen standardisierter ⁵¹Cr-Freisetzung-Assay und Redirected Lysis-Assay untersucht werden (Abb. 34).

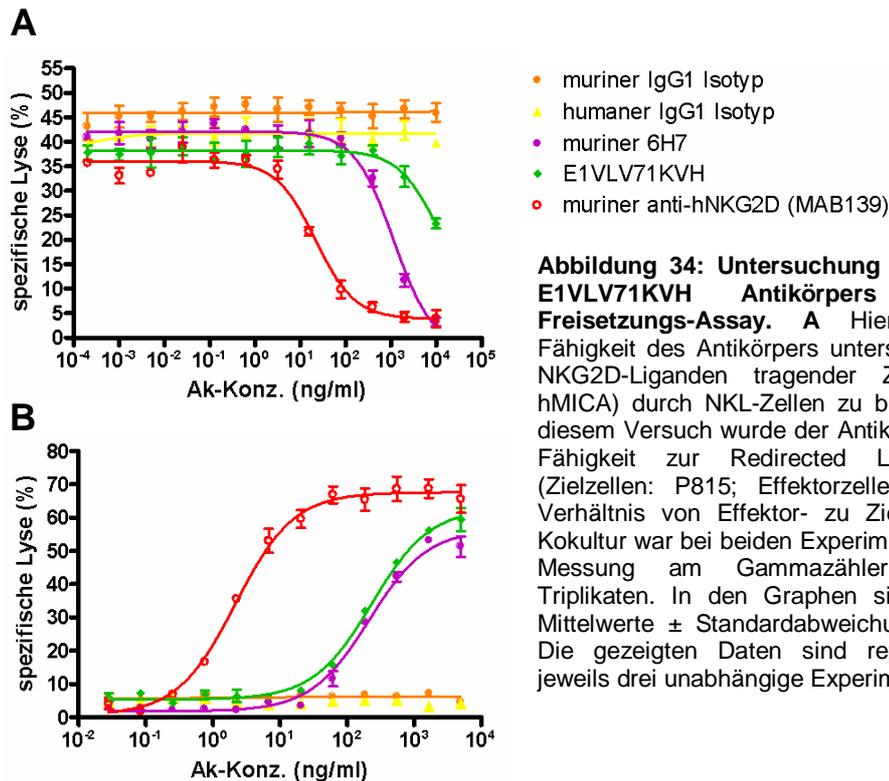


Abbildung 34: Untersuchung des humanen E1VLV71KVH Antikörpers im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay. **A** Hier wurde die Fähigkeit des Antikörpers untersucht, die Lyse NKG2D-Liganden tragender Zellen (BaF/3-hMICA) durch NKL-Zellen zu blockieren. **B** In diesem Versuch wurde der Antikörper auf seine Fähigkeit zur Redirected Lysis getestet. (Zielzellen: P815; Effektorzellen: NKL). Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen in der Kokultur war bei beiden Experimenten 40:1. Die Messung am Gammazähler erfolgte in Triplikaten. In den Graphen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

Für den standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay wurden die NKL-Effektorzellen vor ihrer Inkubation mit BaF/3-hMICA-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des E1VLV71KVH-Antikörpers und den Kontrollantikörpern behandelt. Die höchste Antikörperkonzentration betrug hierbei $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ und wurde in 1:5-Verdünnungsschritten reduziert. In diesem Testsystem konnte man eine deutlich verringerte Inhibierungseffizienz des humanen Antikörpers im Vergleich zum murinen Ausgangsantikörper 6H7 und dem Referenzantikörper MAB139 feststellen (Abb. 34A). Selbst bei einer hohen Konzentration von $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ war der humane E1VLV71KVH Antikörper nicht fähig, die NKG2D-vermittelte Zellyse auf das Basisniveau abzusenken. In der Zell-vermittelten Lyse konnte hingegen gegenüber dem murinen Ursprungsantikörper keine Verschlechterung beobachtet werden (Abb. 34B).

Da jedoch gerade die Fähigkeit zur Inhibierung einer NKG2D-abhängigen Lyse für den Einsatz eines therapeutischen Antikörpers bei Autoimmunerkrankungen von zentraler Bedeutung ist, sollte über eine anschließende Affinitätsmaturierung die Affinität gegenüber dem Antigen NKG2D und dadurch auch dessen antagonistische Effektivität erhöht werden.

4.3 Affinitätsmaturierung eines humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörpers

Die Antikörper, welche aus dem Repertoire der Phagen-Display-Bibliothek generiert werden, besitzen oftmals schon die gewünschten Eigenschaften und können bereits in Methoden wie ELISA, Westernblot oder FACS eingesetzt werden. In einigen Fällen ist jedoch die Affinität dieser Antikörper gegenüber ihrem Antigen für einen diagnostischen oder immuntherapeutischen Einsatz nicht ausreichend (Hoogenboom & Chames, 2000). Häufig wird die Potenz eines Antikörpers neben der Erkennung eines geeigneten Epitops auch von seiner Bindungsstärke bestimmt. Eine Verbesserung der Affinität führt deshalb auch meist zu einer besseren Pharmakokinetik, zu einer reduzierten Dosierung und Toxizität und zur Senkung der Kosten während eines Therapieeinsatzes. Allerdings korreliert die Bindungsstärke eines Antikörpers nicht immer mit seiner biologischen Aktivität, wie z.B. bei der Neutralisierung von Viren oder bei der Bekämpfung von Tumoren gezeigt werden konnte (Hoogenboom, 2005).

Aus den kombinatorischen Phagen-Display-Bibliotheken nicht immunisierter Spender lassen sich hoch affine Antikörper eher selten generieren, so dass im Anschluss meist eine *in vitro* Affinitätsmaturierung notwendig ist (Hoet et al., 2005). Mit Hilfe des Phagen-Display und schrittweiser Selektion mit abnehmenden Antigenkonzentrationen konnte man bereits nahezu 10fach höhere Affinitäten erzeugen (Hoogenboom & Chames, 2000).

Da im Falle der Humanisierung des Anti-hNKG2D Antikörpers über ein Phagen-Display der VL und anschließender schrittweise Humanisierung der VH mit dem Konstrukt E1VLV71KVH kein hoch affiner Antikörper gefunden worden war, sollte ebenfalls eine Affinitätsmaturierung erfolgen. Diese sollte durch Veränderungen der Proteinsequenz in einem ausgewählten Bereich und einem dadurch ermöglichten Epitopdrift die Qualität der Bindung des Antikörpers verbessern. Die Durchführung der Affinitätsmaturierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Tobias Raum (Micromet AG).

4.3.1 Randomisierung der CDR3-Region von VL und VH

In vivo erfolgt eine Affinitätsmaturierung der Antikörper durch das Einfügen somatischer Hypermutationen in den hochvariablen CDRs und einer anschließenden Aussortierung der unterschiedlichen Varianten unter erhöhtem Selektionsdruck. Diese variablen Bereiche innerhalb der VH und VL bestehen aus jeweils drei kurzen Peptidabschnitten von ca. 5 bis 20 Aminosäuren. Diese sechs hypervariablen Abschnitte bilden im nativen Protein die eigentliche Antigenbindungsstelle. Die CDRs 1 bis 3 bilden aufgrund der aus ihrer Aminosäuresequenz resultierenden räumlichen Struktur eine Kontaktfläche zum

Epitop des Antigens und sind so maßgeblich an der Ausbildung der Spezifität eines Antikörpers beteiligt. Den im Zentrum der Antigenbindungsstelle liegenden CDR3s der VH und der VL kommt durch ihre prominente Stellung in der Antigenbindung dabei eine vorrangige Bedeutung zu und wurden deshalb als primäre Bereiche zur Affinitätsoptimierung ausgewählt.

A

Primer	Sequenz
6H7 E1VL	
E1VL_SacI_f E1VL-trunc_r	5'-GTGTGTGAGCTCGTCTGACTCAGCCACCCTCAACG-3' 5'-GCAGTAATAATCAGCCTCATCC-3'
E1 VL-R1_r	5'-GTCAACTTGGTCCCTCCGCCGAA TACGTAAGCACTCAGTCT SNNSNNSNNSNNSN GCAGTAATAATCAGCCTCATCC-3'
E1 VL-R2_r	5'-GTCAACTTGGTCCCTCCGCCGAA TACGTAAGC SNNSNNSNNSNNSN ATAGGACTG GCAGTAATAATCAGCCTCATCC-3'
E1 VL-R3_r	5'-GTCAACTTGGTCCCTCCGCCGAA SNNSNNSNNSNNSNNTCTGTTGT CATAGGACTG GCAGTAATAATCAGCCTCATCC-3'
E1 VL_BsiWISpel_r	5'-CTCTAGACTAGTCGTACGGAGGACGGTCAACTTGGTCCCTCCGCCG-3'
6H7 V71KVH	
VH_V71K_Xho_f VH_V71K-trunc_r	5'-CAGCTGCTCGAGTCAGGACC-3' 5'-TCTGGCACAGTAGTACACG-3'
VH_V71K-R1_BstEII_r	5'-AGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCA GTAACCAAACCAGGCCGC SNNSNNSNNSNNSNNTCTGGCACAGTAGTACACG-3'
VH_V71K-R2_BstEII_r	5'-AGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCA GTAACCAA SNNSNNSNNSNNSN GTACCCCC TCTGGCACAGTAGTACACG-3'
VH_V71K-R3_BstEII_r	5'-AGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCA SNNSNNSNNSNNSN CGCCCC CTC GTACCCCC TCTGGCACAGTAGTACACG-3'

B

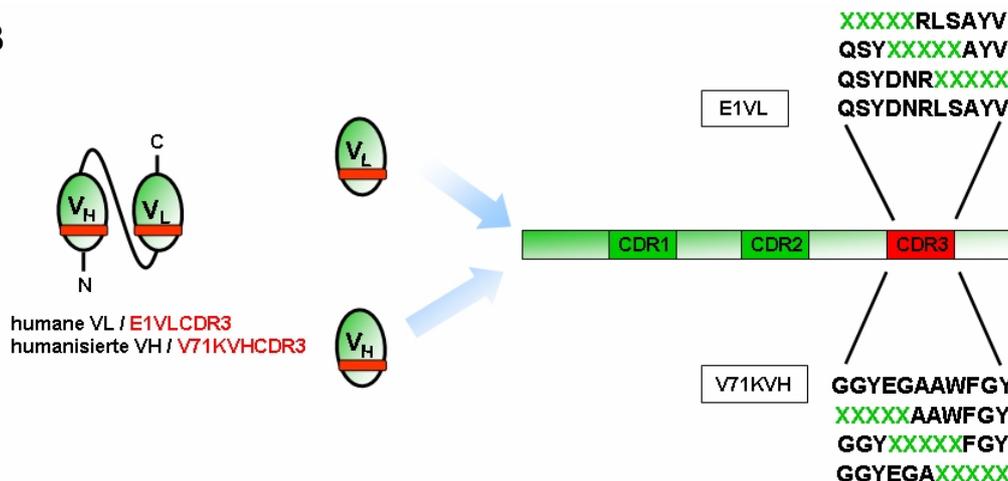


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Randomisierung der CDR3-Bereiche von humanisierter VH und humaner VL zur Verbesserung ihrer Affinitäten. Hierzu wurde durch zufällige Aminosäuresubstitutionen (Randomisierung oder Random-Mutagenese) der VH und VL mittels PCR und synthetisch hergestellter Oligonukleotide (A) die Primärsequenz der CDR3-Region (11 As) verändert. Durch eine anschließende Selektion im Phagen-Display wurden solche Varianten gewonnen, welche die gewünschte Bindungsaktivität für das Antigen NKG2D aufwiesen. **A** In der Tabelle sind die für die Random-Mutagenese verwendeten Primer aufgelistet. Die Bezeichnung SNN stellt hierbei ein Codonäquivalent dar. N ist ein Mix aus allen vier Nukleotiden A, T, G und C; S ein Mix aus G und C. Der Ablauf der PCR-Amplifikationen ist in Abb 28 gezeigt. **B** Schematische Darstellung der Random-Mutagenese. Die mit XXXXX gekennzeichneten Bereiche sollen die Orte der zufälligen Aminosäuresubstitution darstellen.

Die einfachste Form einer Affinitätsmaturierung *in vitro* besteht daher darin, mit Hilfe von speziellen Oligonukleotid-Primern und PCR Phagen-Bibliotheken mit variablen CDR3-Bereichen zu erstellen und anschließend im Phagen-Display unter erhöhten Selektionsbedingungen zu selektieren.

Zur Herstellung dieser variablen CDR-Bereiche wird meist eine Randomisierung, d.h. eine zufällige Substitution von Aminosäuren mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern und PCR in diesen hypervariablen Regionen durchgeführt (Aujame et al., 1997; Hayden et al., 1997; Hoogenboom, 1997).

Um eine Verbesserung der Affinität des humanen E1VLV71KVH Anti-hNKG2D Antikörpers herbeizuführen, wurde sowohl die variable Region der leichten Kette (VL) als auch die variable Region der schweren Kette (VH) durch das Einfügen zufälliger Aminosäuresubstitutionen, d.h. durch eine sogenannte Random-Mutagenese in der CDR3-Region, verändert (Abb. 35). Bei der Randomisierung wurde die Primärsequenz der CDR3-Region von VL und VH durch mehrere PCR-Schritte und unter Verwendung spezieller synthetisch hergestellter Oligonukleotid-Primer (Abb. 35A) in drei überlappenden Bereichen (Abb. 35B) verändert. Die Substitution von Aminosäuren wird durch die Codonäquivalente SNN innerhalb der Primer ermöglicht (Abb. 35A). Während N hierbei den zufälligen Einbau aller vier Nukleotide A, T, G oder C zulässt, kann an Stelle von S nur G oder C eingesetzt werden. Auf diese Weise wurde die zufällige Bildung der Stopcodons TAA und TGA verhindert.

In einem ersten PCR-Schritt wurden zunächst nur die CDR1- und CDR2-Bereiche amplifiziert, und eine reduzierte Form, eine sogenannte Trunc-Version, der VL und VH hergestellt (Abb. 36A/B). Diese wurde in der nachfolgenden PCR wieder als Matrize verwendet, um mit Hilfe der Randomisierungs-Primer die unterschiedlich mutierten CDR3-Regionen an die trunkierte Version anzufügen. Zusätzlich wurden über die PCR-Schritte noch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angefügt, über die eine Klonierung in den Phagen-Display-Vektor pComb5BHis/N2 ermöglicht wurde.

Die drei randomisierten CDR3-Region enthaltenden und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten VL- und VH-Fragmente wurden in einem 2% Agarosegel quantifiziert, dann isoliert und VH und VL anschließend getrennt zu gleichen Teilen vermischt (Abb. 36C). In einem ersten Durchgang der Affinitätsmaturierung wurde zunächst der randomisierte VL-Pool in Kombination mit der bereits humanisierten V71KVH mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SacI* und *SpeI* in den Phagen-Display-Vektor eingebracht (Abb. 38A). Die so generierte Phagen-Bibliothek wurde anschließend mit Hilfe des in solution-Pannings einer Selektion mit erhöhtem Selektionsdruck unterzogen.

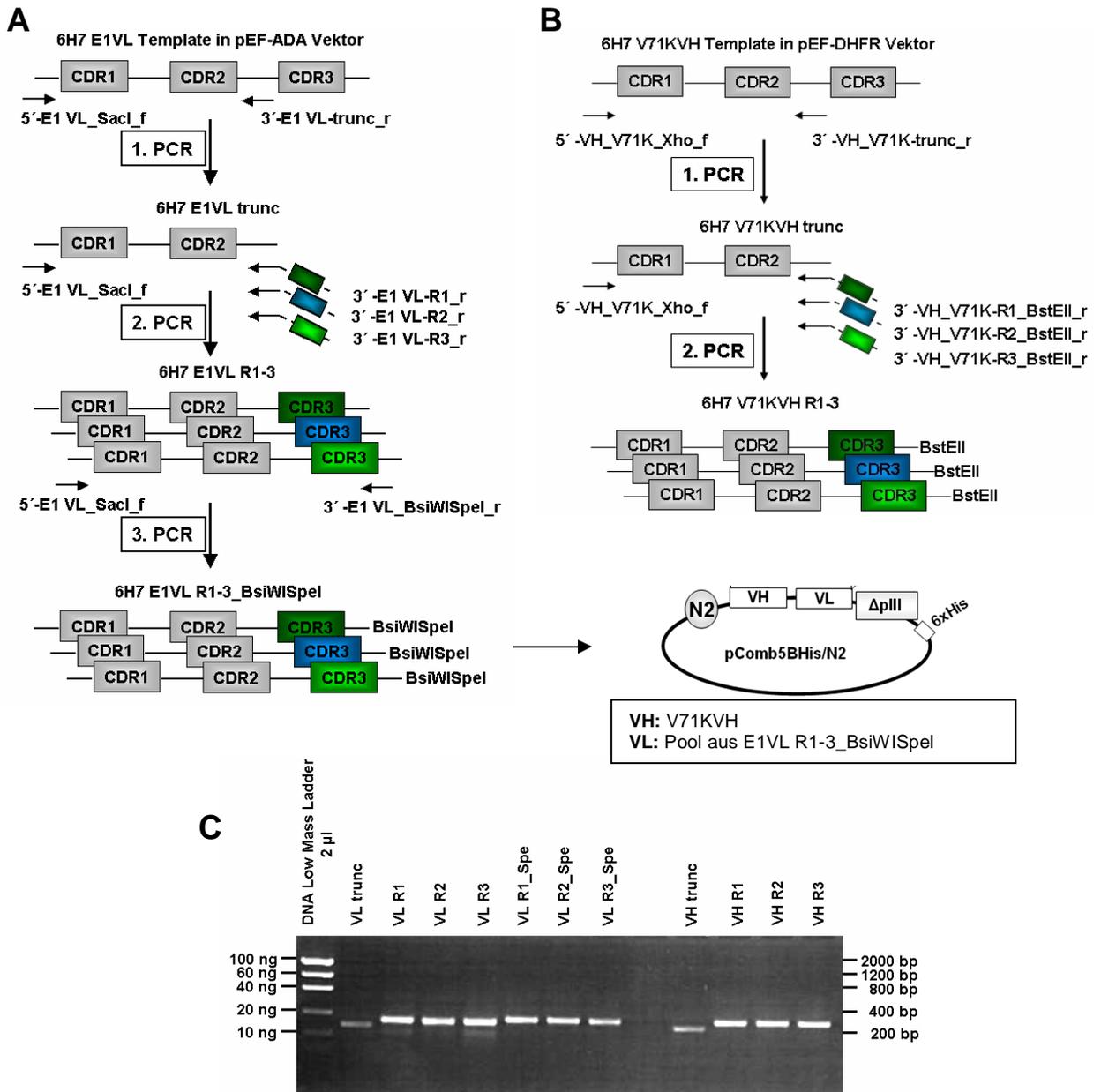


Abbildung 36: Vorgehensweise zur Erstellung einer neuen Phagenbibliothek zur Durchführung der Affinitätsmaturierung des E1VLV71KVH Antikörpers. A/B Schematische Darstellung der durchgeführten PCR-Amplifikationen zur Generierung neuer humaner VL (**A**)- bzw. VH (**B**)-Bibliotheken mit randomisierten CDR3-Bereichen ausgehend von den Konstrukten E1VL in pEF-ADA bzw. V71KVH in pEF-DHFR. Anschließend erfolgte zunächst nur die Klonierung des Pools aus VL R1-R3_Spe in den Phagen-Display-Vektor V71KVH_pCom5BHis/N2. **C** Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikate der einzelnen PCR-Schritte zur Randomisierung des CDR3-Bereichs von VL und VH, sowie DNA-Mengenbestimmung der PCR-Konstrukte.

4.3.2 Affinitätsmaturierung der humanen E1VL mit Hilfe des in solution-Pannings

Für die Isolierung einer höher affinen humanen VL-Kette in Kombination mit der humanisierten VH-Region wurde die Methode des in solution-Panning gewählt (Abb. 37). Bei dieser Technik werden die scFv-tragenden Phagen mit einem löslichen Antigen inkubiert. Das in solution-Panning besitzt den Vorteil, dass die Konzentration des

Antigens genau eingestellt und diese zur Selektion höher affiner scFv in den aufeinander folgenden Selektionsrunden schrittweise herabgesetzt werden kann. Während der insgesamt vier Selektionszyklen wurde die scFv-Phagenlösung mit unterschiedlichen Konzentrationen eines hNKG2D/Fc-Fusionsprotein versetzt. Die Antigenkonzentration betrug in der ersten Runde 100 nM. Sie wurde zur Erhöhung der Stringenz jedoch bereits in der zweiten Runde auf 10 nM, in der dritten auf 1 nM und in der vierten auf 0,1 nM reduziert. Zusätzlicher Selektionsdruck wurde durch die ansteigende Anzahl an Waschschritten während der einzelnen Panning-Runden erreicht.

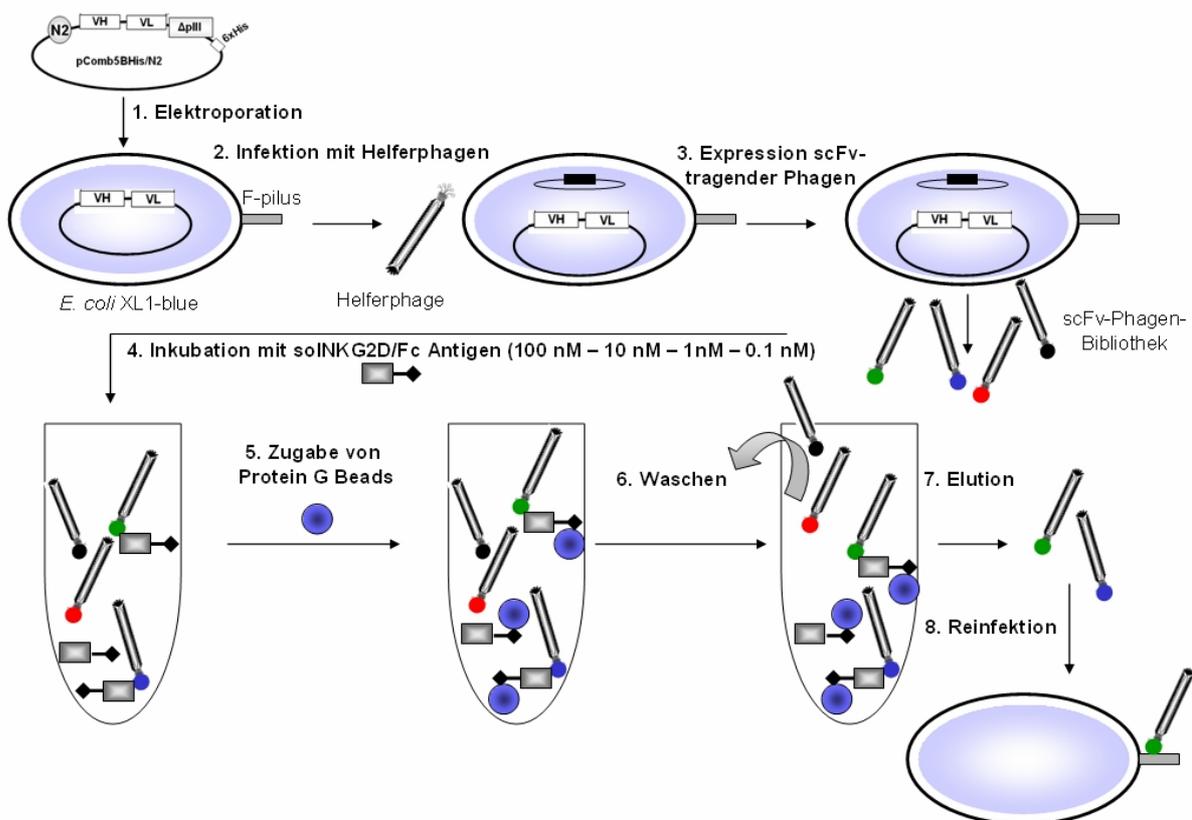


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Durchföhrung der Affinitätsmaturierung des E1VLV71KVH. 1. Elektroporation des Phagen-Display-Vektors pComb5BHis/N2 in *E. coli* XL1-blue. 2. Infektion der Bakterienkultur mit dem Helferphagen VCSM13. 3. Expression scFv-tragender Phagen, die in das Kulturmedium sezerniert werden. 4. Inkubation der gefällten und aufkonzentrierten Phagen mit löslichem NKG2D/Fc-Fusionsprotein und Bindung antigenspezifischer scFv-Phagen an das NKG2D. 5. Zugabe des Antigen-Phagen-Gemisches zu gewaschenen Protein G Beads. Bindung des NKG2D/Fc-Fusionsproteins über den humanen IgGFc-Teil an das Protein G und Ausbildung von Protein G-NKG2D/Fc-scFv-Phagen-Komplexen. 6. Entfernung nicht bindender Phagen aus dem Überstand durch mehrmalige Zugabe von Waschpuffer und anschließender Zentrifugation. 7. Resuspension von Protein G mit Antigen und spezifisch gebundenen scFv-Phagen in Elutionspuffer (pH 2,2) und somit Lösung der Bindung von antigenspezifischen scFv-Phagen an das NKG2D. 8. Nach Neutralisierung des pH-Wertes Reinfektion einer frischen Bakterienkultur mit dem im Eluat enthaltenen Phagen. Neustart einer weiteren Selektionsrunde durch Zugabe von Helferphagen. Es wurden insgesamt 4 Runden durchgeföhrt, hierbei wurde die Konzentration des Antigens schrittweise von 100 nM über 10 nM, 1 nM bis auf 0,1 nM herabgesetzt.

Um das Fc-gekoppelte Antigen zusammen mit daran gebundenen scFv-Phagen aus der Lösung isolieren zu können, wurden Protein G-Beads zugesetzt. Letztlich waren somit antigenspezifische scFv-Phagen über die Bindung an das NKG2D/Fc auch an die

Protein G-Beads gekoppelt (Abb. 37). Diese wurden nun zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen gewaschen. Anschließend wurde die spezifische Bindung von scFv-Phagen an das Antigen durch Herabsetzen des pH-Wertes gelöst. Im Überstand befanden sich nun die zuvor an Antigen gebundenen scFv-Phagen. Der neutralisierte Überstand wurde schließlich zur Reinfektion einer frischen Bakterienkultur verwendet.

Als Hinweis für eine erfolgreiche Selektion hoch affiner Phagenklone konnte die Abnahme des Phagentiters nach Selektion (*output*) gewertet werden. Das Verhältnis von Input- zu Output-Titer stieg von $1,4 \times 10^8$ nach der zweiten Panning-Runde über $5,1 \times 10^8$ nach der dritten Panning-Runde auf $2,9 \times 10^9$ nach der vierten Panning-Runde bei stetiger Reduktion der Antigenkonzentration und ansteigender Anzahl der Waschschrte deutlich an.

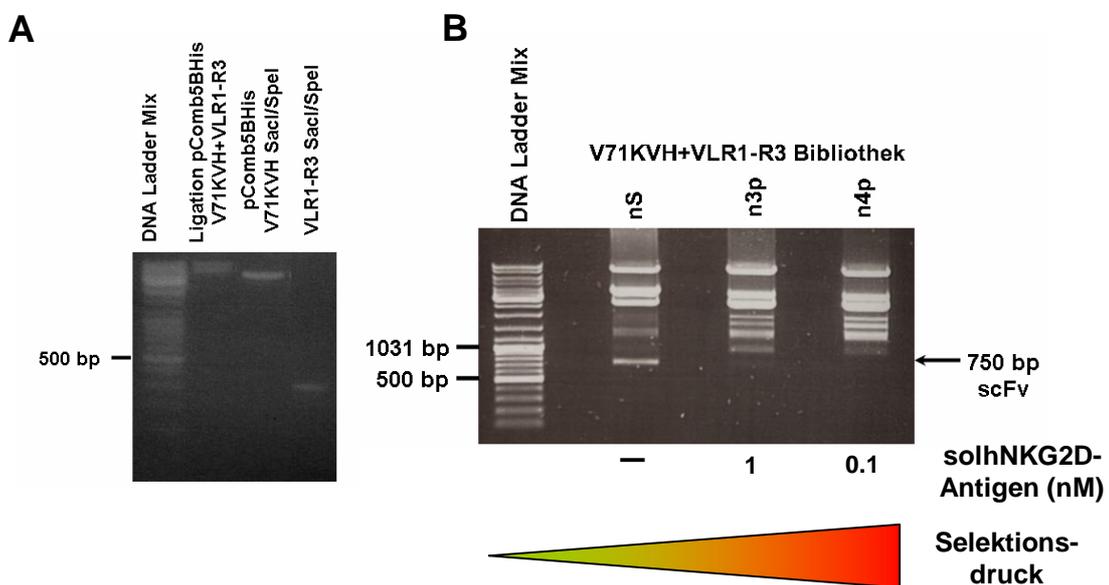


Abbildung 38: Affinitätsmaturierung der E1VL. **A** Die Ligation des pComb5BHis/N2 V71KVH-Vektors mit dem VLR1-R3-Pool über *SacI/Spel* wurde vor Elektroporation in *E. coli* XL1-blue im DNA-Gel kontrolliert. **B** Restriktionsverdau der pComb5BHis/N2 V71KVH + VLR1-R3-Pool Phagen-Bibliothek mit *XhoI* und *SpeI* nach vier Selektionsrunden. Nach Durchführung der Affinitätsmaturierung der E1VL wurde die DNA der Phagenbibliothek V71KVH + VLR1-R3 Pool aus den einzelnen Panning-Schritten aufgereinigt und anschließend durch einen Restriktionsverdau mit *XhoI* und *SpeI* auf das Vorhandensein von scFv untersucht. In der Abbildung ist die gelelektrophoretische Auftrennung der V71KVH + VLR1-R3-Pool Bibliothek gezeigt. Abkürzungen: nS: nach Schuß bzw. Elektroporation; n3p-4p: nach 3.-4. Panning.

Im Anschluss an die Selektion wurden die Plasmide der Phagen produzierenden *E. coli*-Kulturen aus der Amplifikationsphase nach dem dritten und vierten Panningschritt isoliert. In diesem Pool aus pComb5BHis/N2-Plasmiden war nun die gesamte genetische Information der bis zu diesem Zeitpunkt selektierten scFv enthalten. Im DNA-Gel konnte man deutlich erkennen, dass mit zunehmendem Selektionsdruck die Menge an scFv-DNA reduziert wurde und man somit annehmen konnte, dass sich in diesem scFv-Pool hauptsächlich höher affin bindende scFv-Klone befanden (Abb. 38B).

Für die Analyse einzelner, spezifisch bindender scFv wurden die für die scFv kodierenden DNA-Fragmente aus dem Plasmidpool über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SpeI* ausgeschnitten (Abb. 38B) und in einen entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pComb5BF/HdeIN2 ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* TG1 wurden nun einzelne Kolonien gepickt und für das Screening, das bereits in Kapitel 4.2.3 ausführlich beschrieben wurde, nach hoch affinen scFv am FACS vorbereitet.

Da die Affinitätsmaturierung der VL mittels in solution-Pannings mit löslichem NKG2D erfolgte, war es notwendig die Bindungsaktivität bei dem folgenden Selektionsprozess auch an membranständigem NKG2D sicher zu stellen.

4.3.3 Generierung von drei hoch affinen humanen VL-Ketten mit Hilfe des in solution-Pannings

Aus dem in der ersten Affinitätsmaturierung gewonnenen scFv-Pool sollten im nächsten Schritt Einzelklone isoliert und anschließend analysiert werden. Das Ziel war hierbei die Selektion von Antikörperfragmenten, die membrangebundenes NKG2D spezifisch binden. Während der Untersuchung der Bindungsfähigkeit mehrerer hundert Klone am FACS konnten acht neue NKG2D-bindende scFv gefunden werden.

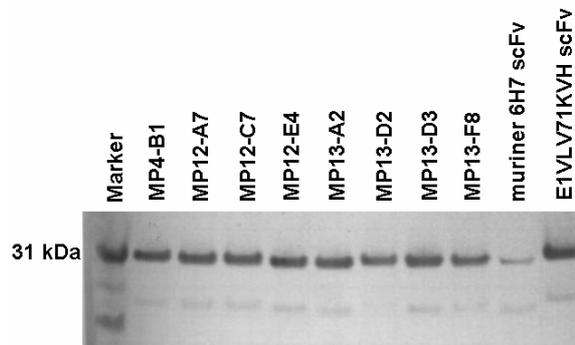


Abbildung 39: Westernblot von aufgereinigten scFv nach Affinitätsmaturierung der VL. Die Überstände aus dem periplasmatischen Aufschluss verschiedener Klone wurden über Ni-NTA Spin-Säulen aufgereinigt und anschließend mittels SDS-Page aufgetrennt. Zum Nachweis der scFv wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte über einen Biotin-konjugierten Anti-His Antikörper und Streptavidin-AP. MP: Master Platte.

Für die Sequenzierung dieser Klone wurden Mini-Präparationen hergestellt. Anhand des Vergleichs der DNA-Sequenzen mit der ursprünglichen E1VL-Sequenz wurde überprüft, ob die Randomisierung erfolgreich verlaufen war. Man konnte in allen acht Sequenzen Randomisierungsvorgänge nachweisen, wobei bei diesen acht Klonen hauptsächlich im vorderen und mittleren Bereich des CDR3 eine Aminosäuresubstitution festzustellen war (Abb. 41). Für eine nähere Charakterisierung der Bindungseigenschaften am FACS wurden alle acht scFv über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst die Expression dieser scFv in einem kleineren

Maßstab und die anschließende Periplasmapräparation nach der “Freeze & Thaw”-Methode durchgeführt. Die im Periplasma enthaltenen scFv wurden unter Verwendung von Ni-NTA-Säulen aufgereinigt und über Nacht in PBS umgepuffert.

Von den umgepufferten scFv-Proben wurde eine kleine Menge für ein Proteingel abgenommen, in dem die Expressionsmenge der einzelnen scFv überprüft wurde, um später die Bindungsaktivitäten im FACS auswerten zu können. Für die Detektion His₆-markierter scFv wurde ein Westernblot durchgeführt (Abb. 39).

Der Westernblot wies deutliche Expressionsunterschiede der verschiedenen Konstrukte auf. Während die Produktion des humanen E1VLV71KVH-scFv durch *E. coli* TG1 sehr gut zu sein schien, wurde der ursprüngliche murine 6H7-scFv nur sehr schwach exprimiert. Die Expressionsniveaus der scFv mit neuer humaner VL nach der ersten Runde der Affinitätsmaturierung wichen hingegen kaum voneinander ab (Abb. 39).

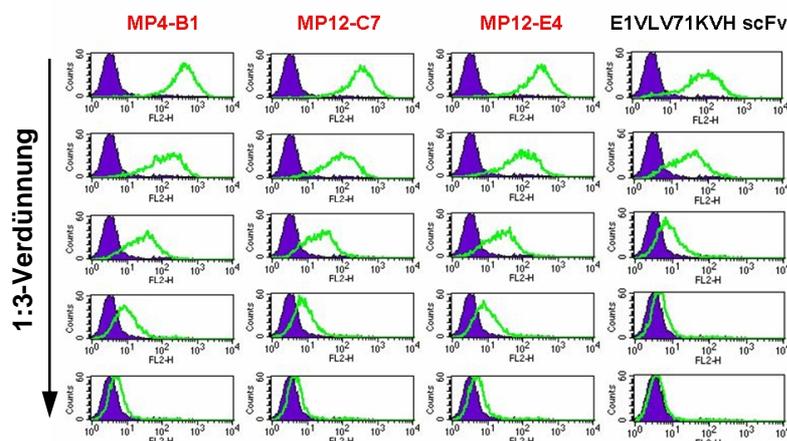


Abbildung 40: Untersuchung der Bindungsaktivität der aufgereinigten scFv nach Affinitätsmaturierung der VL im FACS. Die Bindungseigenschaften der aufgereinigten periplasmatischen Überstände wurden am FACS auf NKL-Zellen überprüft. Hierzu wurde von den aufgereinigten scFv eine Verdünnungsreihe (1:3) auf den NKG2D positiven Zellen erstellt. Die Detektion der gebundenen scFv erfolgte über einen murinen Anti-FLAG Antikörper (M2, Sigma) mit anschließender Inkubation mit einem PE-konjugiertem Ziege Anti-Maus Antikörper. In der Abbildung sind die drei besten Binder im Vergleich zum Ausgangskonstrukt E1VLV71KVH gezeigt.

Die Bindungseigenschaften dieser aufgereinigten neuen scFv wurden anschließend auf NKL-Zellen am FACS im Vergleich zu dem ursprünglichen humanen E1VLV71KVH-scFv analysiert. Um höher affine scFv, die auch bei niedrigen Konzentrationen noch eine gute Antigenbindung aufweisen, selektieren zu können, wurde die Bindung der scFv bei unterschiedlichen Titrationsstufen untersucht (Abb. 40). Die bei der Affinitätsmaturierung generierten scFv zeigten hierbei eine dreifach bessere Bindungsstärke gegenüber dem humanen Ausgangskonstrukt E1VLV71KVH-scFv, dessen Bindung auf NKL-Zellen trotz höherer Ausgangskonzentration bereits nach der vierten Verdünnungsstufe nicht mehr detektiert werden konnte (Abb. 40).

Schließlich wurden drei VL-Ketten, B1, C7 und E4, die acht durch die Affinitätsmaturierung generierten scFv als Leitstrukturen für die nachfolgende Affinitätsmaturierung der V71KVH ausgewählt. Diese drei VL-Ketten zeichneten sich bei der Titration auf NKL-Zellen durch eine stärkere Bindungsfähigkeit an membrangebundenes NKG2D im Vergleich zu den anderen maturierten humanen VL-Ketten aus (Daten nicht gezeigt). Bei einem Sequenzvergleich aller affinitätsmaturierten CDR3-Bereiche der E1VL konnte zwischen B1-, C7- und E4-VL zudem eine ähnliche Sequenzabfolge festgestellt werden (Abb. 41).

	CDR3-Region		
	<hr/>		
human 6H7 E1 VL	QSY	DNRLSAYV	FGGGTKLTV
MP4-B1	QSY	ETR T NAYV	FGGGTKLTV
MP12-C7	QSY	ENHS N AYV	FGGGTKLTV
MP12-E4	QSY	ENVR N AYV	FGGGTKLTV
MP12-A7	QSY	DNRMLRYT	FGGGTKLTV
MP12-A2	QSY	DNRL L AYV	FGGGTKLTV
MP12-D3	QSY	DNRIAAYV	FGGGTKLTV
MP12-F8	QSY	STAFNAYV	FGGGTKLTV
MP12-D2	QSY	DNRK R MYM	FGGGTKLTV

Abbildung 41: Sequenzvergleich der CDR3-Bereiche der affinitätsmaturierten VL-Sequenzen. Mittels Vector NTI wurden die CDR3-Regionen der aus dem Phagen-Display selektierten VL-Ketten nach erfolgter Affinitätsmaturierung miteinander verglichen

Weiterhin konnte anhand der Sequenzen innerhalb der CDR3-Region der C7VL mit der Sequenzabfolge NHS eine Glykosylierungsstelle an Position 93-95 identifiziert werden.

4.3.4 Identifizierung von fünf hoch affinen Klonen mittels Affinitätsmaturierung der humanisierten V71KVH

Für die folgende Affinitätsmaturierung der humanisierten V71KVH wurde der randomisierte VH-Pool in Kombination mit den drei ausgewählten humanen VL-Ketten B1, E4 und C7 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *BstEII* in den Phagen-Display-Vektor eingebracht.

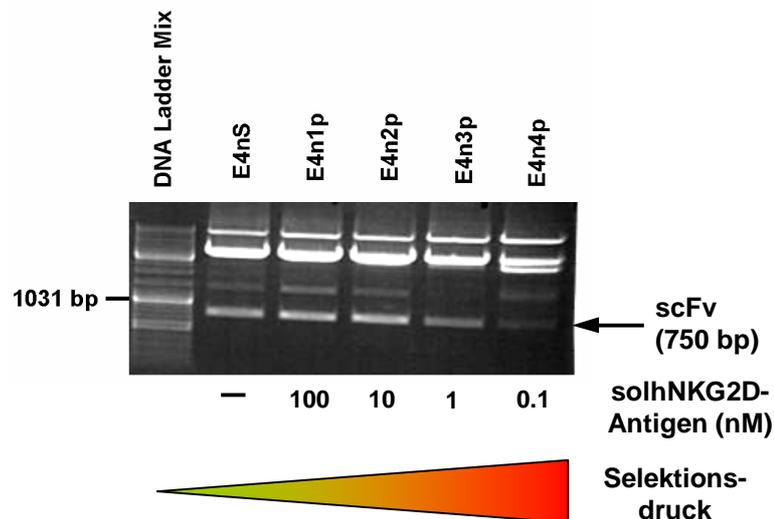


Abbildung 42: Restriktionsverdau der pComb5BHis/N2 E4VL + humVHR1-R3-Pool Phagen-Bibliothek mit *XhoI* und *SpeI* nach vier Selektionsrunden. Nach Durchführung der Affinitätsmaturierung der V71KVH wurde die DNA der drei Phagenbibliotheken B1VL + humVHR1-R3-Pool, C7VL + humVHR1-R3-Pool und E4VL + humVHR1-R3-Pool aus den einzelnen Panning-Schritten aufgereinigt und anschließend durch einen Restriktionsverdau mit *XhoI* und *SpeI* auf das Vorhandensein von scFv untersucht. In der Abbildung ist die gelelektrophoretische Auftrennung der E4VL + humVH-Pool Bibliothek gezeigt. Abkürzungen: nS: nach Schuß bzw. Elektroporation; n1p-4p: nach 1.-4. Panning.

Diese drei unterschiedlichen Phagen-Bibliotheken wurden anschließend ebenfalls mit Hilfe des in solution-Pannings (Abb. 37) einem Selektionsprozess mit abnehmender Antigenkonzentration unterzogen. Im Anschluss an diese Affinitätsmaturierung erfolgte die Isolation der Plasmide aus den drei Phagen-Bibliotheken nach der dritten und vierten Selektionsrunde. Nach diesem in solution-Panning konnte im DNA-Gel ebenfalls eine Korrelation zwischen zunehmendem Selektionsdruck und abnehmender DNA-Menge an scFv festgestellt werden (Abb. 42).

Für die anschließende Untersuchung einzelner scFv-produzierenden Klone wurden die kodierenden DNA-Fragmente aus dem jeweiligen Plasmidpool mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *SpeI* ausgeschnitten (Abb. 42) und in entsprechend geschnittene Expressionsvektoren pComb5BF/HdeIN2 ligiert. Nach Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* TG1 wurden aus allen drei unterschiedlichen Bibliotheken E4VL+, B1VL+, C7VL+humVHR1-R3-Pool mehrere hundert Klone mittels FACS-Screen auf ihre Bindung an membranständiges NKG2D getestet.

CDR3-Region			
V71KVH	GGY	EGAAW	FGY
MP14-H5/B8/D1	GGY	PGSHN	FGY
MP14-B11	GGY	PGSTN	FGY
MP14-C3	GGY	PGSSH	FGY
MP14-C12	GGY	PGSNN	FGY
MP14-H3	GGY	PGSAL	FGY
MP14-A11	GGY	PGSHY	FGY
MP14-A12	GGY	PGSHH	FGY
MP15-G10	GGY	PGSGN	FGY
MP15-C3/G1	GGY	PGHNG	FGY
MP14-B6	GGY	PGAAN	FGY
MP14-F7	GGY	AGAVN	FGY
MP14-H4	GGY	AGSHN	FGY
MP14-D12/G8	GGY	SGSSN	FGY
MP14-C1/F2/C7	SLY	PGAAW	FGY

Name	Sequenz	VL
V71KVH	GGYEGAAWFGY	E1VL
MP14-H5	GGYPGSHNFGY	B1VL
MP15-C3	GGYPGHNGFGY	C7VL
MP14-B6	GGYPGAANFGY	B1VL
MP14-C12	GGYPGSNNFGY	C7VL
MP15-G10	GGYPGSGNFGY	E4VL

Abbildung 43: Sequenzvergleich der CDR3-Bereiche der affinitätsmaturierten VH-Sequenzen. Mittels Vector NTI wurden die CDR3-Regionen der aus dem Phagen-Display selektierten VH-Ketten nach erfolgter Affinitätsmaturierung miteinander verglichen.

Insgesamt konnten fünfzehn unterschiedliche antigenspezifische scFv-Klone gefunden werden (Abb. 43). Hierbei unterschied sich der Klon MP14-B8 aufgrund seiner Kombination mit der C7VL von den beiden Klonen MP14-H5 und MP-14-D1, welche beide mit der B1VL kombiniert waren. Die affinitätsmaturierten VH-Ketten wurden ebenfalls zur Kontrolle einer erfolgreichen Randomisierung des CDR3-Bereiches nach ihrer Retransformation in *E. coli* TG1 und Mini-Präparation sequenziert. Durch vergleichende Sequenzanalysen mit der ursprünglichen V71KVH konnte in allen fünfzehn Klonen eine Random-Mutagenese nachgewiesen werden (Abb. 43).

Sechs der sequenzierten VH-Klone waren mit der C7VL kombiniert, weitere sechs VH-Klone besaßen eine B1VL und lediglich drei VH-Klone waren mit der E4VL kombiniert (Abb. 43). Um eine Vorauswahl aus diesen fünfzehn verschiedenen Klonen treffen zu können, wurden von diesen in 96-well Platten periplasmatische Aufschlüsse hergestellt und die Bindung der darin enthaltenen scFv auf NKL-Zellen am FACS bei unterschiedlichen Titrationsstufen getestet (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser Daten wurden acht scFv-Klone für eine weitere Charakterisierung der Bindungseigenschaften ausgewählt (Abb. 44). Diese wurden nach ihrer Expression und anschließender Periplasmapräparation über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt und über Nacht in PBS

umgepuffert. Zur Überprüfung der Expressionsmengen der einzelnen scFv wurde von den umgepufferten scFv-Proben jeweils eine kleine Menge für ein Proteingel entnommen. Die Detektion His₆-markierter scFv erfolgte im Westernblot (Abb. 44).

Die Bindungseigenschaften dieser acht aufgereinigten scFv wurden anschließend wieder anhand einer Titration auf NKL-Zellen am FACS im Vergleich zu dem ursprünglichen E1VLV71KVH-scFv analysiert (Abb. 45). Für die Untersuchung der Affinitätszunahme der einzelnen Klone musste immer die im Westernblot detektierte Expressionsmenge berücksichtigt werden (Abb. 44).

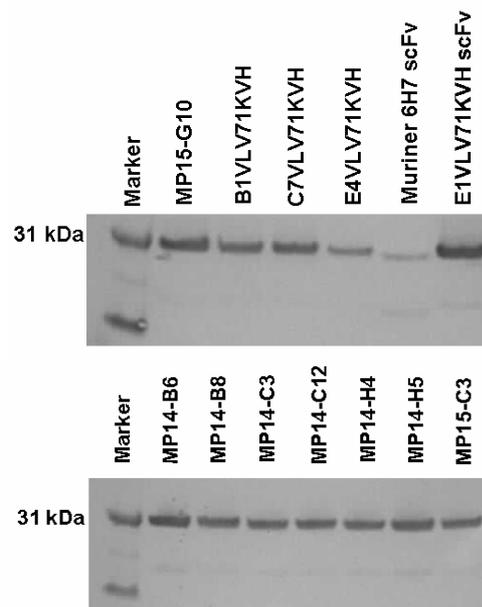


Abbildung 44: Westernblot von Ni-NTA aufgereinigten scFv nach Affinitätsmaturierung der VH. Die periplasmatischen Aufschlüsse verschiedener Klone wurden über Ni-NTA Spin-Säulen aufgereinigt und anschließend mittels SDS-Page aufgetrennt. Zum Nachweis der scFv wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte über einen Biotin-konjugierten Anti-His Antikörper und Streptavidin-AP.

Die nach der Affinitätsmaturierung der V71KVH generierten scFv zeigten im Vergleich zum ursprünglichen E1VLV71KVH-scFv eine nahezu 100-fach bessere Bindungsaktivität. Während dessen Bindung auf NKL-Zellen trotz höherer Ausgangskonzentration bereits nach der vierten Verdünnungsstufe nicht mehr detektiert werden konnte, war die Bindung der affinitätsmaturierten scFv auch noch nach der siebten Verdünnungsstufe nachweisbar (Abb. 45).

Anhand der bei den Titrationsexperimenten ermittelten Daten wurden aus den acht neu generierten humanen scFv die fünf besten Binder ausgewählt. Diese fünf humanen Anti-hNKG2D-scFv, B1VLB6VH, C7VLC12VH, B1VLH5VH, C7VLC3VH und E4VLG10VH, wurden in ein vollständiges humanes IgG1-Format überführt. Zur Produktion ganzer humaner IgG1 Antikörper in eukaryotischen Zellen wurden die

variablen Domänen der schweren und der leichten Kette des humanen scFv in die Expressionsvektoren pEF-DHFR und pEF-ADA kloniert. Die dafür verwendete Klonierungsstrategie wurde bereits in Kapitel 4.2.5 für die Generierung des E1VLV71KVH Antikörpers ausführlich beschrieben.

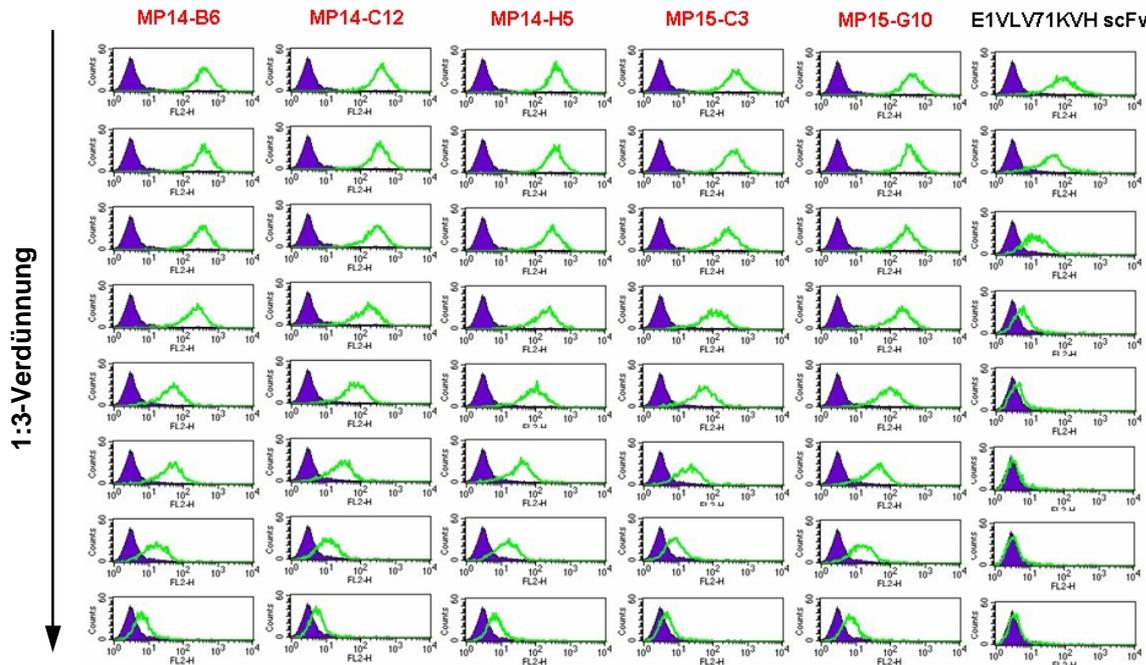


Abbildung 45: Untersuchung der Bindungsaktivität der aufgereinigten scFv nach Affinitätsmaturierung der VH im FACS. Die Bindungseigenschaften der aufgereinigten periplasmatischen Überstände wurden mittels FACS auf NKL-Zellen überprüft. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (1:3) der aufgereinigten scFv auf den NKG2D positiven Zellen erstellt. Die Detektion der gebundenen scFv erfolgte über einen murinen Anti-FLAG Antikörper (M2, Sigma) und anschließender Inkubation mit einem PE-konjugiertem Ziege Anti-Maus Antikörper. In der Abbildung sind die besten fünf Binder im Vergleich zum Ausgangskonstrukt E1VLV71KVH dargestellt.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit den neu generierten Konstrukten an membrangebundenes NKG2D auf NKL-Zellen konnten den Erfolg der Affinitätsmaturierung bestätigen. So konnten mit Hilfe der Methode des in solution-Pannings aus dem schwachen Binder E1VLV71KVH Antikörper-Fragmente mit wesentlich höheren hNKG2D-Affinitäten gewonnen werden.

Da die Analyse der Antikörperbindung mittels Titration zunächst keine exakten Daten zu den Affinitäten der Antikörper geliefert hatte, sollten mit Hilfe des Biacore mehr Informationen über die Assoziations- und Dissoziationseigenschaften der Antikörper gewonnen werden. Zudem sollte die biologische Aktivität von zwei der affinitätsmaturierten Antikörper in weiteren Testsystemen untersucht werden, da eine stärkere Bindung eines Antikörpers nicht zwingend eine bessere Inhibierungsaktivität bedeutet.

4.4 Charakterisierung der maturierten humanen Anti-hNKG2D spezifischen Antikörper

Die Spezifitäten und biologischen Eigenschaften der humanen Antikörper sollten im Anschluß an ihre Produktion in einem eukaryotischen System mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren analysiert werden. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften sollten die mittels Protein G gereinigten Antikörper in FACS- und Biacore-Bindungsstudien eingesetzt werden. Weiterhin sollte die Temperatur- und Serumstabilität der Antikörper im Hinblick auf einen späteren therapeutischen Einsatz im menschlichen Organismus untersucht werden. Eine durch die Affinitätsmaturierung hervorgerufene mögliche Epitopdrift der Antikörper sollte anhand von Kreuzreaktivitäts-Analysen mit NKG2D-Molekülen anderer Spezies überprüft werden.

Für einen Einsatz der Antikörper als Immuntherapeutikum bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist eine umfassende Untersuchung hinsichtlich ihrer agonistischen und antagonistischen Eigenschaften unerlässlich. Zu diesem Zweck sollten die humanen Anti-hNKG2D Antikörper in die beiden *in vitro*-Systeme, standardisierter ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay und Redirected Lysis-Assay, eingesetzt werden. Anhand der im Microarray ermittelten NKG2D-spezifischen Biomarker sollte die Effektivität der Antikörper-vermittelten Inhibition und Aktivierung näher charakterisiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass der NKG2D-Rezeptor infolge einer Interaktion mit seinen Liganden internalisiert wird (Groh et al., 2002; Coudert et al., 2005; Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005; Song et al., 2006), sollte ebenfalls untersucht werden, ob dieses Ereignis auch nach Bindung eines Anti-NKG2D Antikörpers eintritt.

4.4.1 Vergleichende Untersuchung ihrer Bindungsaffinitäten mittels FACS und Biacore

Die fünf ausgewählten Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH, C7VLC12VH, B1VLH5VH, C7VLC3VH und E4VLG10VH sollten zunächst nochmals hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität analysiert werden. Hierzu mussten für die Bindungsstudien am FACS und am Biacore ausreichende Mengen an vollständigen Antikörpermolekülen generiert werden.

Für die Produktion der Antikörpermoleküle im kleinen Maßstab war es ausreichend, die beiden Expressionsplasmide für die schwere und die leichte Kette transient in HEK 293-F Suspensions-Zellen zu transfizieren. Infolge dieser Kotransfektion wurden von den eukaryotischen Zellen vollständige Antikörpermoleküle exprimiert und in das Zellkulturmedium sezerniert (Abb. 30). Schließlich wurden die Anti-hNKG2D IgG1 Antikörper mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine Protein-G Säule aus den

Zellkulturüberständen isoliert. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Patrick Hoffmann (Micromet AG).

4.4.1.1 Die maturierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine deutlich verbesserte Bindung an membranständiges NKG2D

Da eine gute Bindung an das membranständige hNKG2D für die biologische Aktivität der Antikörper eine große Rolle spielt, sollte die Affinität der Antikörper in einer ersten Bindungsstudie auf NKG2D-tragenden NKL-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden ausgehend von einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml Verdünnungsreihen (1:3) erstellt (Abb. 46A/C).

Um die Reinheit und die über OD₂₈₀ bestimmten Proteinkonzentrationen der einzelnen aufgereinigten Antikörper zu bestätigen, wurde jeweils 1 µg des jeweiligen Konstrukts und zweier Positiv-Kontrollen (MAB139 und muriner 6H7 Antikörper) auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. Hierbei konnte für alle fünf produzierten Konstrukte eine einwandfreie Reinigung über Protein G und die Genauigkeit der Proteinkonzentrationen festgestellt werden (Abb. 46B/D).

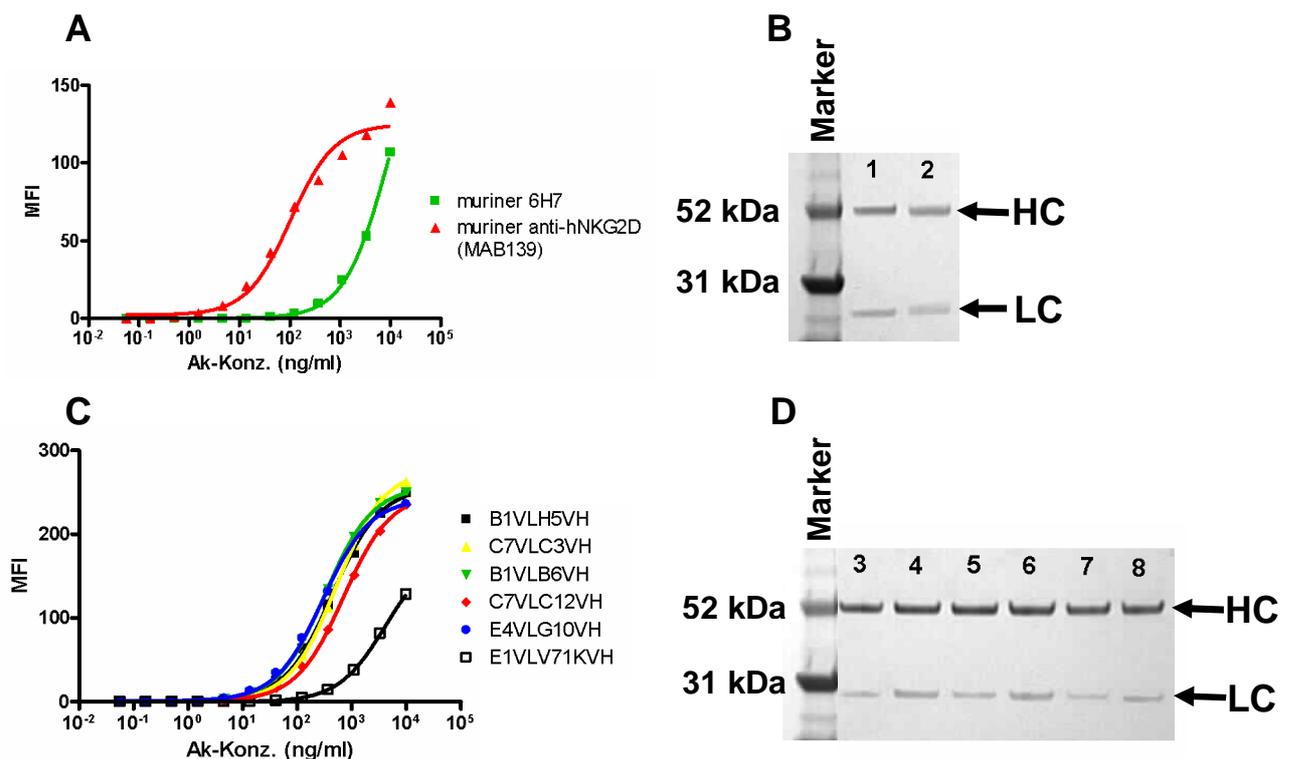


Abbildung 46: Untersuchung der Bindungsaktivitäten der humanen Anti-hNKG2D Antikörper nach Affinitätsmaturierung auf NKL-Zellen. A/C Mittels FACS wurden die affinitätsmaturierten Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf ihre Bindungseigenschaften an NKL-Zellen getestet B/D Die fünf Anti-hNKG2D Antikörper wurden in HEK293-F-Suspensions-Zellen produziert und die Zellkulturüberstände anschließend mittels Affinitätschromatographie über eine Protein G-Säule aufgereinigt. Zur Überprüfung der Reinheit und der Proteinkonzentrationen (OD₂₈₀-Messung) der einzelnen aufgereinigten Antikörper wurde jeweils 1 µg Protein der verschiedenen Konstrukte und zweier Positiv-Kontrollen (MAB139 und muriner 6H7 Antikörper) auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. 1: muriner Anti-hNKG2D (MAB139), 2: murine 6H7, 3: E1VLV71KVH, 4: B1VLH5VH, 5: C7VLC3VH, 6: B1VLB6VH, 7: C7VLC12VH, 8: E4VLG10VH.

Eine vergleichende Bindungsanalyse der beiden murinen Anti-hNKG2D Antikörper MAB139 und 6H7 zeigte die deutlichen Unterschiede in deren Affinitäten (Abb. 46A). Während der murine 6H7 Antikörper selbst bei einer Konzentration von 10 µg/ml die Sättigungsphase noch nicht erreicht hatte, trat der murine MAB139 bei dieser Konzentration bereits in die Absättigung ein. Beim Vergleich der Titrationskurven der affinitätsmaturierten humanen Anti-hNKG2D mit der des ursprünglich generierten humanen Antikörpers E1VLV71KVH ließ sich eine ca. 100fach verbesserte Bindungsaktivität der Antikörper nach erfolgter Affinitätsmaturierung feststellen (Abb. 46C).

Um das Bindungsgleichgewicht der unterschiedlichen Antikörper genauer zu untersuchen und die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (KD) zu bestimmen, sollten daher als Nächstes die Assoziations- und Dissoziationsraten mittels Biacore analysiert werden.

4.4.1.2 Die maturierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper besitzen eine deutlich höhere Affinität

Für eine sensitivere Affinitätsanalyse der generierten, humanen Anti-hNKG2D-Antikörper sollte deren Dissoziationskonstante (KD) mittels Biacore bestimmt werden.

Tabelle 6: Kinetische Charakterisierung der Bindungseigenschaften verschiedener Anti-hNKG2D Antikörper mittels Biacore. Die Assoziations- und Dissoziationsraten der aufgereinigten Anti-hNKG2D Antikörper wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen und anschließend aus diesen Werten die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (KD) errechnet. Die Messung erfolgte in einer Verdünnungsreihe an einem mit rekombinanten humanen NKG2D/Fc (1299-NK, R&D Systems) beschichteten CM5-Sensorchip im Biacore-Gerät. Es wurden 60 µl der Antikörperverdünnung über einen Zeitraum von 3 min in die Flusszelle injiziert (Assoziation). Anschließend wurde mit Laufpuffer HBS-EP gewaschen (Flussrate 20 µl/min) und die Dissoziation über einen Zeitraum von 5 min beobachtet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte (nach Langmuir) mit der BIA-Evaluation-Software unter Bestimmung des Mittelwertes aus 3 Einzelmessungen unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen. In der Tabelle sind jeweils die Mittelwerte aus drei Einzelmessungen ± Standardabweichung angegeben.

Antikörper	kd (1/s)	ka (1/Ms)	KD = kd/ka (M)
muriner anti - human NKG2D (MAB 139, R&D Systems)	$4.40 \pm 1.13 \times 10^{-5}$	$1.30 \pm 0.42 \times 10^6$	$3.40 \pm 0.07 \times 10^{-11}$
muriner 6H7	$4.35 \pm 1.06 \times 10^{-4}$	$4.40 \pm 0.42 \times 10^4$	$4.50 \pm 4.50 \times 10^{-8}$
humaner E1VLV71KVH	$6.09 \pm 0.85 \times 10^{-5}$	$4.35 \pm 0.64 \times 10^4$	$1.65 \pm 0.50 \times 10^{-9}$
humaner C7VLC3VH	$1.00 \pm 0.00 \times 10^{-5}$	$3.05 \pm 0.07 \times 10^5$	$3.30 \pm 0.28 \times 10^{-11}$
humaner C7VLC12VH	$2.10 \pm 0.71 \times 10^{-5}$	$2.90 \pm 0.14 \times 10^5$	$7.25 \pm 2.05 \times 10^{-11}$
humaner B1VLH5VH	$1.50 \pm 0.00 \times 10^{-5}$	$2.65 \pm 0.50 \times 10^5$	$5.80 \pm 1.00 \times 10^{-11}$
humaner B1VLB6VH	$9.95 \pm 2.90 \times 10^{-6}$	$4.30 \pm 0.42 \times 10^5$	$2.25 \pm 0.35 \times 10^{-11}$
humaner E4VLG10VH	$9.30 \pm 4.53 \times 10^{-6}$	$3.53 \pm 0.25 \times 10^5$	$2.70 \pm 1.40 \times 10^{-11}$

Dazu erfolgte die Ermittlung von Assoziations- und Dissoziationskonstante über eine Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Analyse am Biacore-Gerät in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe von Tobias Raum (Micromet AG). Dazu wurde die Bindung der unterschiedlichen Antikörper in einer Verdünnungsreihe an einen mit hNKG2D/Fc Fusionsprotein beschichteten Sensorchip gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wurde das Bia-Evaluation-Programm verwendet. In Tab. 6 sind die ermittelten

Assoziations- und Dissoziationskonstanten sowie die errechneten Werte der Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation (KD) aufgelistet. Die KD-Werte der meisten Moleküle lagen im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-11} M. Die Ergebnisse aus dem Biacore bestätigten die zuvor am FACS generierten Bindungsdaten. Der ursprüngliche E1VLV71KVH Antikörper besaß mit einer KD von $1,65 \pm 0,50 \times 10^{-9}$ M eine deutlich niedrigere Affinität zu dem löslichen Antigen NKG2D als die affinitätsmaturierten Antikörper, die eine KD im Bereich von 10^{-11} M aufwiesen.

Für die weitere Charakterisierung der humanen Antikörper hinsichtlich ihrer biologischen Funktionalität wurden die beiden hoch affinen Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH ausgewählt, da sie im Vergleich zu den anderen humanen Antikörpermolekülen sowohl in den Bindungsstudien am FACS als auch am Biacore die besseren Ergebnisse geliefert hatten.

4.4.2 Produktion der hoch affinen humanen Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH

Für die Untersuchung der biologischen Aktivität dieser Antikörper in unterschiedlichen *in vitro*-Systemen (s. 4.4) wurden größere Mengen dieser Moleküle benötigt. Hierzu wurden die beiden Konstrukte stabil in CHO-dhfr⁻-Zellen transfiziert.

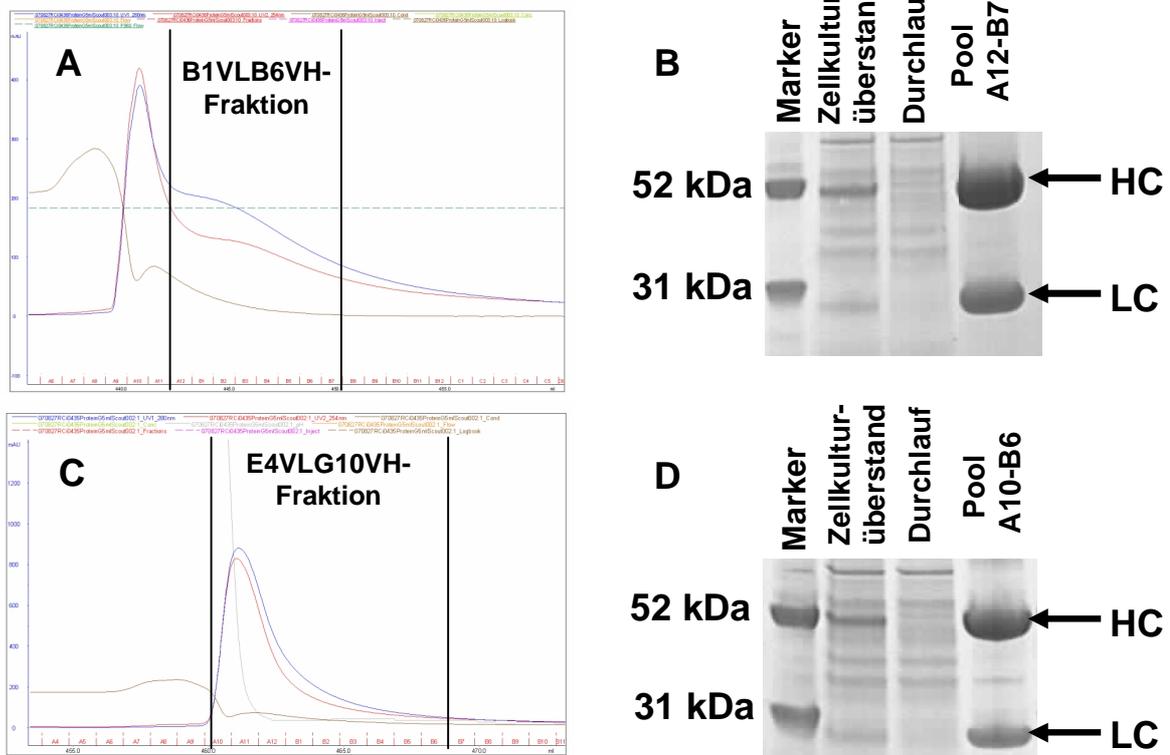


Abbildung 47: Aufreinigung der humanen IgG1 Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH mittels Affinitätschromatographie. Nach Produktion der beiden Antikörper durch stabile CHO-Transfektanten wurden diese über eine Protein G-Säule aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Zur Kontrolle der Reinheit wurden die aufgereinigten Antikörper mittels SDS-Page aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. **A/C** Chromatogramme der Aufreinigung der Antikörper über Protein G. **B/D** Coomassie-Gele nach Aufreinigung der Antikörper. Abkürzungen: HC: Heavy Chain; LC: Light Chain.

Aus den Zellkulturüberständen wurden die beiden IgG1-Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH affinitätschromatographisch über eine Protein-G Säule in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Patrick Hoffmann (Micromet AG) aufgereinigt (Abb. 47A/C). Mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Färbung des Gels mit Coomassie (Abb. 47B/D) konnte die Reinheit der Antikörpermoleküle festgestellt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte über eine OD₂₈₀-Messung.

4.4.3 Untersuchung der Temperatur- und Serumstabilität

Um die unterschiedlichen Anti-hNKG2D-Antikörper auf ihre thermische Stabilität zu untersuchen, wurden die vollständigen, humanen IgG1-Antikörper E1VLV71KVH, B1VLB6VH, E4VLG10VH und der murine Kontroll-Antikörper MAB139 ansteigenden Temperaturen ausgesetzt und anschließend auf ihre biologische Aktivität überprüft. Zunächst wurden alle vier Moleküle für 5 min auf Temperaturen von 40 – 100°C erhitzt.

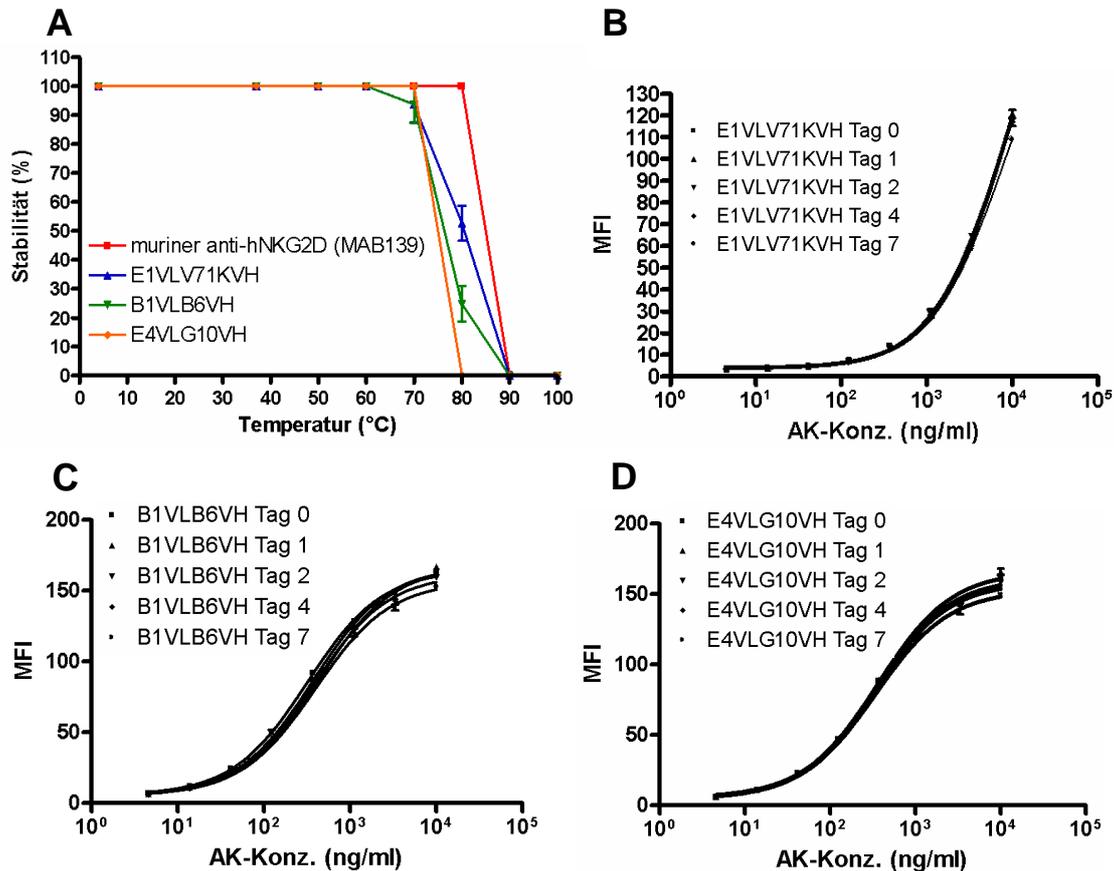


Abbildung 48: Untersuchung der Temperatur (A)- und Serumstabilität (B-D) der humanen Anti-hNKG2D Antikörper. **A** Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurden die Antikörper muriner Anti-hNKG2D (MAB139; R&D Systems), E1VLV71KVH, B1VLB6VH und E4VLG10VH (1 µg/ml) für 5 min unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt (4 - 100°C) und anschließend im FACS auf NKL-Zellen auf ihre Bindungsfähigkeit hin überprüft. **B-D** Bei der Analyse der Serumstabilität wurden die humanen Antikörper human 6H7, B1VLB6VH und E4VLG10VH jeweils für 1, 2, 4 oder 7 Tage bei 37°C in Anwesenheit von 50% humanem Serum inkubiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Aktivität und Bindungsfähigkeit der Antikörper wurde schließlich im FACS auf NKL-Zellen getestet. AK: Antikörper.

Nach dem Erhitzen wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt und deren Bindungseigenschaften mit Hilfe einer Titrationskurve auf NKG2D-exprimierenden NKL-Zellen am FACS analysiert. Für die Ermittlung der maximalen Bindungsstärke wurden auch nicht hitzebehandelte Antikörper als Kontrolle mitgeführt. Wie Abb. 48A zeigt, war die Sensitivität aller Antikörper gegenüber Inaktivierung durch Hitzeeinwirkung ähnlich ausgeprägt.

Der murine Kontrollantikörper MAB139 war bis zu einer Temperatur von 80°C gleichbleibend aktiv und verlor erst ab 90°C vollständig seine Bindungsfähigkeit. Während der humane E4VLG10VH Antikörper bereits bei 80°C instabil wurde, verloren die beiden IgG-Antikörper B1VLB6VH und E1VLV71KVH erst zwischen 80-90°C graduell an Aktivität (Abb. 48A). Alle vier Antikörper konnten demnach einer Hitzeeinwirkung von bis zu 70°C problemlos standhalten.

Da die Resistenz gegenüber Serumproteasen bei einem immuntherapeutischen Einsatz eines Antikörpers eine besonders wichtige Eigenschaft darstellt, wurde ein Vergleich der Stabilität aller drei humanen Antikörper in Humanserum durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper E1VLV71KVH, B1VLB6VH und E4VLG10VH in 50% Humanserum verdünnt und bis zu 7 Tage bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Bioaktivität aller Proben parallel in einer Bindungsstudie mittels FACS untersucht. Abb. 48B-D zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Alle drei Moleküle erwiesen sich dabei als äußerst stabil. Selbst nach einer Inkubation für 7 Tage bei 37°C war kein Verlust in der biologischen Aktivität zu erkennen. Die Bindung an membranständiges hNKG2D erfolgte unabhängig vom Vorhandensein von Serumproteasen mit der gleichen Effizienz.

Anhand der Ergebnisse konnte für die beiden humanen Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH sowohl eine ausreichende Temperatur- als auch Serumstabilität nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften würden demnach bei einem späteren Einsatz im Humansystem keine limitierenden Faktoren darstellen.

4.4.4 Analyse der Kreuzreaktivität

Um einen späteren Einsatz der Anti-hNKG2D Antikörper in einem relevanten Tiermodell zu rechtfertigen, sollten deren Bindungseigenschaften auf unterschiedlichen NKG2D-Spezies mittels FACS untersucht werden. Hierzu mussten zunächst CHO-NKG2D⁺/DAP10⁺-Transfektanten der unterschiedlichen Spezies *M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus* und *M. musculus* generiert werden (Abb. 50). Für die Spezies *H. sapiens* waren bereits CHO NKG2D⁺/DAP10⁺-Transfektanten aus Vorarbeiten vorhanden (Arbeitsgruppen von Ralf Lutterbüse und Roman Kischel, Micromet AG).

4.4.4.1 Klonierung verschiedener NKG2D- und DAP10-Spezies

Da die jeweiligen NKG2D- und DAP10-Konstrukte bzw. NKG2D/DAP10-Transfektanten der unterschiedlichen Spezies nicht verfügbar waren, mussten diese selbst kloniert werden. Für die Herstellung von Expressionsvektoren zur Produktion von membranständigem NKG2D und DAP10 unterschiedlicher Spezies auf CHO-dhfr-Zellen wurde zunächst cDNA aus PBMCs gewonnen und die DNA-Sequenzen von NKG2D und DAP10 über PCR mit Hilfe von bestimmten Primern amplifiziert (Abb. 49A/B).

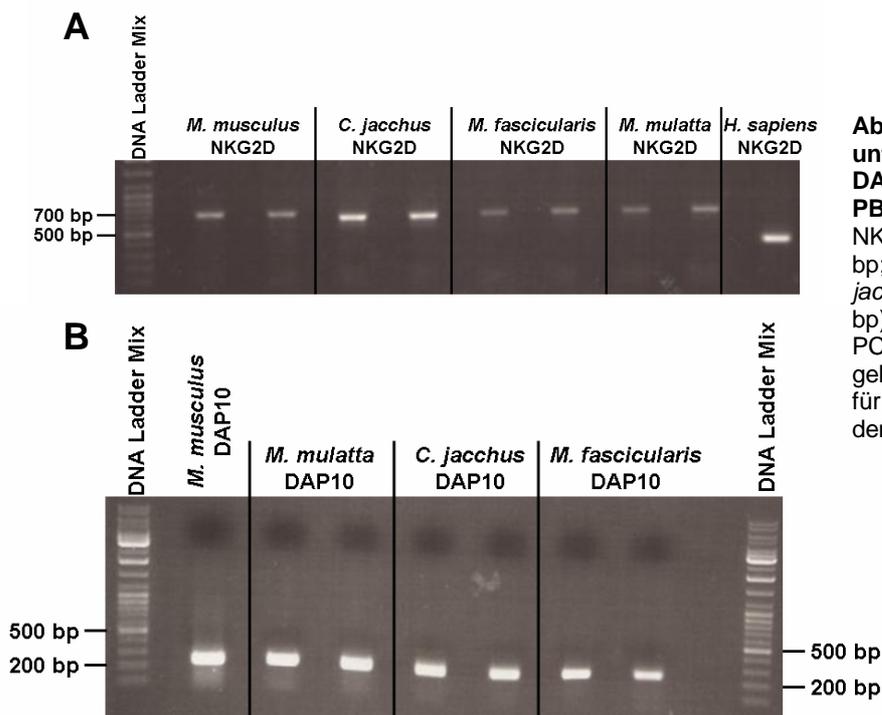


Abbildung 49: Amplifikation der unterschiedlichen NKG2D und DAP10 Spezies aus cDNA von PBMCs. A/B Nach Amplifikation der NKG2D-DNA (*H. sapiens* ca. 400 bp; *M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus* und *M. musculus* ca. 700 bp) bzw. DAP10 (ca. 300 bp) mittels PCR wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und für weitere Klonierungsschritte aus dem Gel extrahiert.

Die Generierung spezifischer Primer basierte auf den folgenden speziesspezifischen Sequenzen von NKG2D und DAP10 aus der PubMed Datenbank (Tab. 7):

Tabelle 7: Accessionnr. der für die Primer-Generierung verwendeten DNA-Sequenzen aus der Datenbank.

Spezies	NKG2D (Accessionnr.)	DAP10 (Accessionnr.)
<i>M. mulatta</i>	AF190943	AF321610
<i>M. fascicularis</i>	AJ426429	AJ554300
<i>C. jacchus</i>	EF050435	-
<i>M. musculus</i>	NM_033078	AF358138

Anschließend wurden die über Gelextraktion aufgereinigten DNA-Fragmente in den pGEM-T Easy Vektor subkloniert. Nach Überprüfung der DNA-Sequenzen wurden über eine weitere PCR an die NKG2D- und DAP10-Sequenzen in den pGEM-T Easy-Vektoren Restriktionsschnittstellen zur Umklonierung in die entsprechenden Vektoren pEF-DHFR oder pEF-ADA angefügt (Abb. 50).

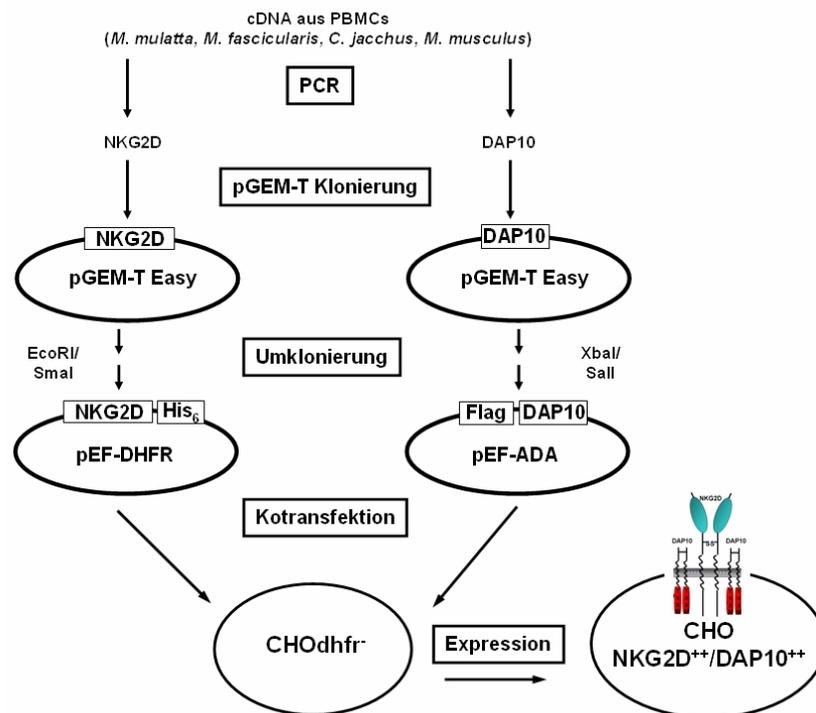


Abbildung 50: Klonierung und Expression von membrangebundenem NKG2D und DAP10 unterschiedlicher Spezies. Ausgehend von der cDNA vier verschiedener Spezies wurden die DNA-Sequenzen von NKG2D und DAP10 mittels PCR amplifiziert. Die Konstrukte wurden zunächst einzeln in pGEM-T Easy-Vektoren subkloniert und schließlich über das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an die Konstrukte NKG2D (*EcoRI* und *SmaI*) und DAP10 (*XbaI* und *Sall*) in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEF-DHFR-His und pEF-ADA-FLAG umkloniert. Hierbei wurden die vier NKG2D Spezies jeweils mit einem His-Marker und die DAP10 Spezies mit einem FLAG-Marker fusioniert. Durch die Kotransfektion beider eukaryotischer Expressionvektoren in CHO-dhfr-Zellen erfolgte die Produktion von membrangebundenem NKG2D und DAP10. Durch eine anschließende Selektion mit Hilfe der Zytostatika Methotrexat (MTX) und Desoxycoformicin (dCF) wurden stabile NKG2D⁺/DAP10⁺-Transfektanten generiert.

Die PCR-Produkte wurden ebenfalls in pGEM-T Easy Vektoren subkloniert. Die unterschiedlichen NKG2D-Spezies wurden anschließend über *EcoRI* und *SmaI* in einen ebenso geschnittenen pEF-DHFR-Vektor mit C-terminalem His-Tag ligiert. Die unterschiedlichen DAP10-Spezies wurden hingegen über *XbaI* und *Sall* in einen ebenso geschnittenen pEF-ADA-Vektor mit N-terminalem FLAG-Tag ligiert. Die fertigen Konstrukte wurden zur Herstellung von DNA-Maxi-Präparationen in NovaBlue-Bakterien transformiert.

Die Expressionsvektoren aus der Maxi-Präparation wurden nochmals sequenziert, durch vergleichende Sequenzanalysen sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene mit der Software Vector NTI kontrolliert (Abb. 51) und schließlich für die Transfektion von CHO-dhfr⁻-Zellen verwendet (Abb. 50).

Die Aminosäuresequenzen von NKG2D und DAP10 der unterschiedlichen Spezies wurden hierbei mit Sequenzen aus der Datenbank (Tab. 8) und Sequenzen aus der Literatur verglichen (Biaassoni et al., 2005; Averdam et al., 2007).

Tabelle 8: Accessionnr. der für die vergleichende Sequenzanalyse verwendeten Aminosäuresequenzen aus der Datenbank.

Spezies	NKG2D (Accessionnr.)	DAP10 (Accessionnr.)
<i>H. sapiens</i>	AAL65233	AAD46987
<i>M. mulatta</i>	AAF74539	AAL37223
<i>M. fascicularis</i>	CAD19993	CAD86941
<i>C. jacchus</i>	ABN45890	-
<i>M. musculus</i>	NP_149069	AAK52752

Die von *M. mulatta* und *M. fascicularis* generierten NKG2D-Sequenzen waren zu 100% zueinander identisch und stimmten mit den Sequenzen aus der Datenbank und der Literatur überein. Eine Übereinstimmung mit der Referenzsequenz konnte auch für die Sequenz des murinen NKG2D gezeigt werden. Lediglich für NKG2D von *C. jacchus* wurde im Bereich vor dem His-Tag ein Unterschied zu der Sequenz aus der Datenbank festgestellt. Dort wurde statt der Aminosäurefolge QKTV die Sequenzabfolge QRTV erhalten. Die Aminosäuresequenzen des NKG2D von *M. mulatta* und *M. fascicularis* waren hierbei zu 94,4% identisch mit der von *H. sapiens* und zu 85% zu der von *C. jacchus*. Zwischen *H. sapiens* und *C. jacchus* lag die Sequenzidentität bei 83,6%, zwischen *C. jacchus* und *M. musculus* bei 55,8% und zwischen *M. musculus* und *H. sapiens* bei 54,9%.

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Kotransfektion von NKG2D mit DAP10 einer anderen Spezies zu einer verminderten Expression des NKG2D-Rezeptors an der Zelloberfläche führen kann (Biaassoni et al., 2005). Aus diesem Grund war es wichtig, speziesspezifische DAP10-Sequenzen zu identifizieren. Während die DAP10 Datenbanksequenzen von *M. mulatta* und *M. fascicularis* nur zu 97,5% identisch waren, wurde im Laufe der eigenen Klonierungen eine 100% identische Sequenz gefunden. Die Abweichungen zur Datenbanksequenz AAL37223 von *M. mulatta* wurden hierbei in der Sequenzabfolge SLLI statt SPLI im transmembranen Bereich und der Abfolge EDG statt GDG im zytoplasmatischen Bereich registriert.

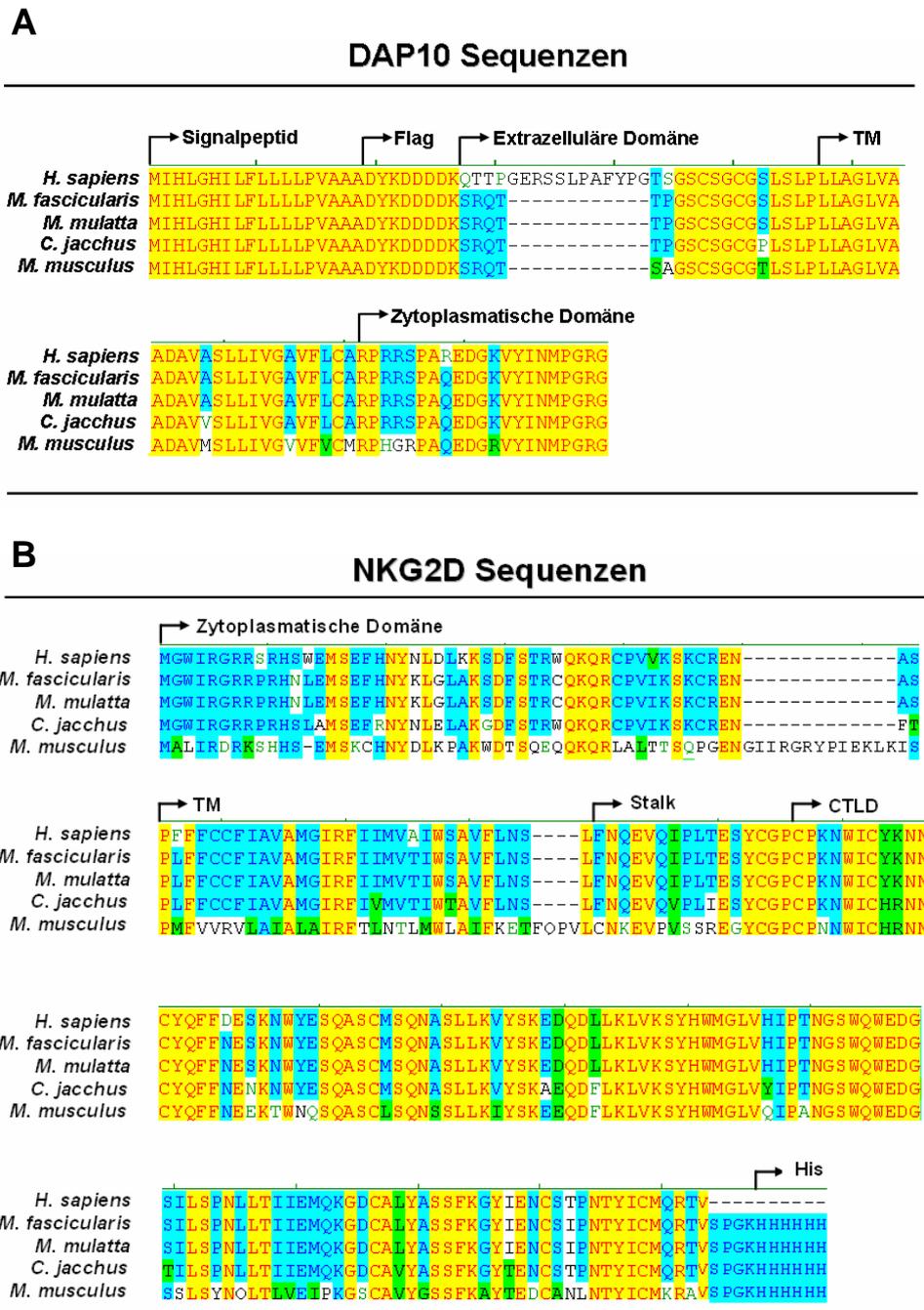


Abbildung 51: Sequenzen der unterschiedlichen NKG2D und DAP10 Spezies. A/B Nach Klonierung in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEF-DHFR bzw. pEF-ADA wurden die Konstrukte nochmals sequenziert und die erhaltenen NKG2D bzw. DAP10 Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen aus der Datenbank verglichen und auf ihre Richtigkeit überprüft. TM: transmembran.

Die beiden Aminosäuren S und R direkt hinter dem FLAG-Tag bei den vier Spezies *M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus* und *M. musculus* bildeten die Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Xba*I. Das DAP10 von *H. sapiens* besaß diese nicht, da hier der FLAG-Tag direkt über PCR angefügt worden war. Für die DAP10-Sequenz von *C. jacchus* konnte in der Datenbank keine Vergleichssequenz gefunden werden. *M. mulatta*, *M. fascicularis* und *H. sapiens* besaßen eine Sequenzhomologie von

82,2%. Beim Vergleich der *H. sapiens* und der *M. musculus* Sequenz waren 72,3% identisch, wobei in beiden Fällen die aufgrund der Restriktionsschnittstelle eingefügten Aminosäuren S und R berücksichtigt werden müssen. Zwischen *M. mulatta/fascicularis* und *C. jacchus* lag die Sequenzhomologie bei 97,8% und bei *C. jacchus* und *M. musculus* bei 87,6%.

4.4.4.2 Die affinitätsmaturierten Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH zeigen eine veränderte Kreuzreaktivität

Zur Kontrolle einer optimalen Expression von NKG2D und DAP10 an der Membranoberfläche der CHO-Zellen wurde der NKG2D-Rezeptor über einen His-Tag, das Adaptermolekül DAP10 über einen FLAG-Tag nachgewiesen. Lediglich die Expression des *H. sapiens* NKG2D wurde aufgrund eines fehlenden His-Tags direkt über einen Anti-hNKG2D Antikörper detektiert (Abb. 52A). Somit konnte sowohl für NKG2D als auch für sein Adaptermolekül DAP10 eine Expression auf den CHO-Transfektanten nach der zweiten Selektionsrunde festgestellt werden (Abb. 52A).

Um eventuelle Kreuzreaktivitäten der humanen Antikörper zu untersuchen, wurden die verschiedenen CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Transfektanten mit den unterschiedlichen Anti-hNKG2D-Antikörpern inkubiert. Hierzu wurden 5 µg/ml des jeweiligen Antikörpers oder seiner Isotyp-Kontrolle eingesetzt und dessen Bindung anschließend über einen PE-konjugierten Ziege Anti-human IgG bzw. PE-konjugierten Ziege Anti-Maus IgG detektiert (Abb. 52B). Der murine 6H7 und der humane E1VLV71KVH Antikörper konnten neben dem humanen NKG2D auch den NKG2D-Rezeptor von *M. mulatta* und *M. fascicularis* erkennen. Bei den beiden affinitätsmaturierten humanen Antikörpern konnten noch weitere Kreuzreaktivitäten beobachtet werden. Während der Antikörper B1VLB6VH zusätzlich auch an das Marmoset (*C. jacchus*) NKG2D band, konnte bei dem E4VLG10VH-Antikörper bei allen fünf Spezies eine Bindung nachgewiesen werden, wobei die Bindungsstärke bei den Spezies *C. jacchus* und *M. musculus* deutlich niedriger war (Abb. 52B).

Die nachgewiesene Kreuzreaktivität der beiden Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH mit dem NKG2D-Rezeptor der Spezies *C. jacchus* und *M. musculus* könnte hierbei auf eine Epitopdrift während der Affinitätsmaturierung zurückgeführt werden. Möglicherweise könnte die Erkennung eines anderen Epitops durch die Antikörper nicht nur deren Affinität, sondern auch deren biologische Aktivität verbessern.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften der Antikörper im ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay und im Redirected Lysis-Experiment näher charakterisiert.

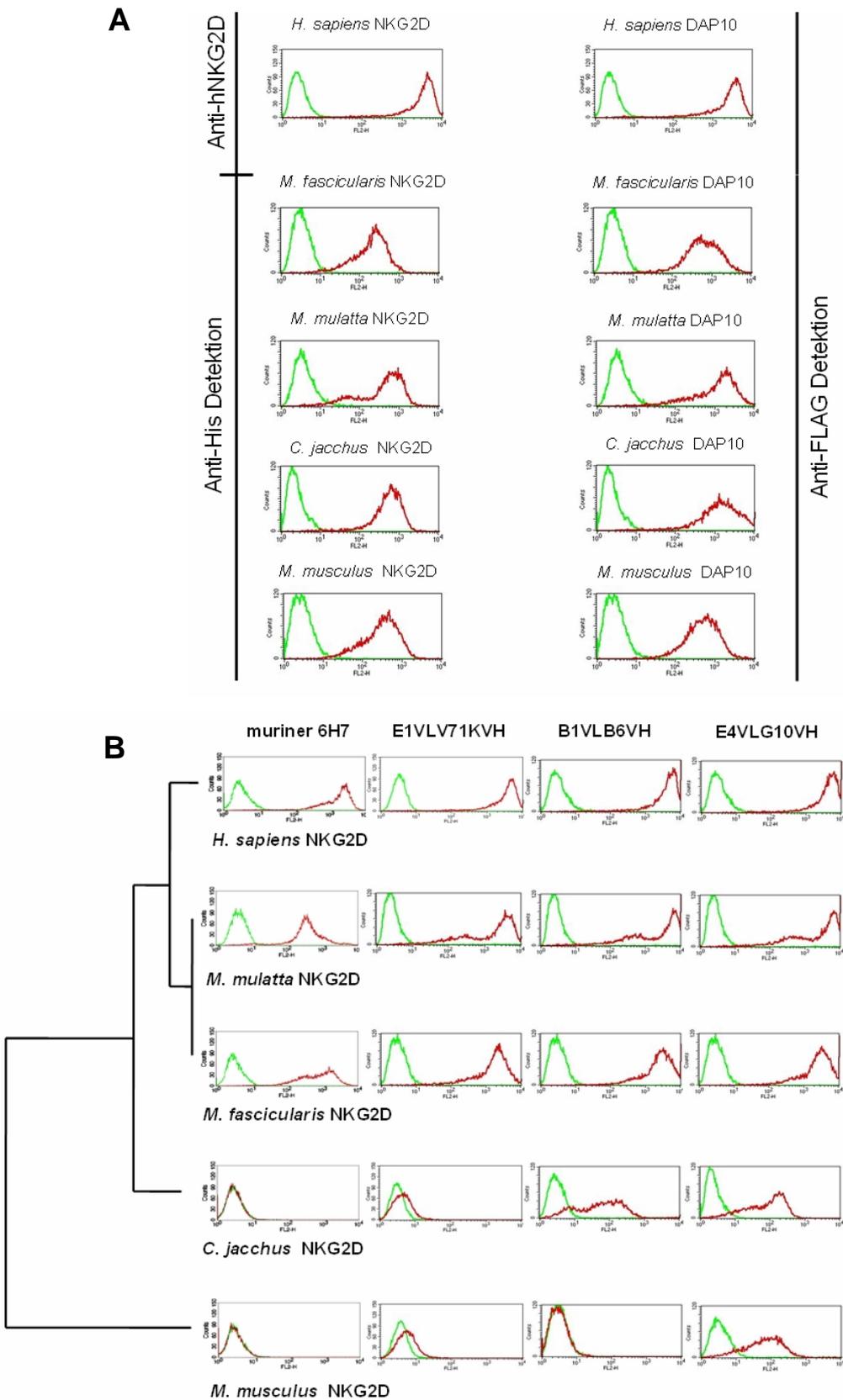


Abbildung 52: Kreuzreaktivität des murinen 6H7 und der verschiedenen humanisierten 6H7 Antikörper. **A** Die Expression der unterschiedlichen NKG2D-His/DAP10-FLAG Spezies (*Homo sapiens*; *Macaca mulatta*; *Macaca fascicularis*; *Callithrix jacchus*; *Mus musculus*) auf CHO-Transfektanten wurde im FACS getestet. NKG2D wurde über einen His-Tag, humanes NKG2D mittels Anti-hNKG2D Antikörper (MAB139, R&D Systems) detektiert. Die DAP10 Expression wurde über einen Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. **B** Die Bindungseigenschaften der vier Antikörper (muriner 6H7; E1VLV71KVH; B1VLB6VH; E4VLG10VH) wurden auf den unterschiedlichen NKG2D-Spezies untersucht.

4.4.5 Die affinitätsmaturierten Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH weisen in den ^{51}Cr -Freisetzungs-Experimenten eine deutlich bessere biologische Aktivität auf

In vorausgegangenen Untersuchungen der Antikörper muriner 6H7 und der ersten humanen Version E1VLV71KVH konnten im ^{51}Cr -Freisetzungs-Experiment relativ schwache inhibitorische Effekte nachgewiesen werden.

Zur Analyse der biologischen Funktionalität der nun humanen und affinitätsmaturierten Anti-hNKG2D Antikörper wurden *in vitro* ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay und Redirected Lysis-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser beiden *in vitro*-Versuche sollte geklärt werden, ob die Affinitätsmaturierung neben einer veränderten Kreuzreaktivität auch eine verbesserte biologische Aktivität der Antikörper bewirken konnte.

Im standardisierten ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay wurden die NKL-Effektoren vor ihrer Inkubation mit BaF/3-hMICA-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:3-Verdünnungen) der jeweiligen humanen Anti-hNKG2D Antikörper behandelt. Als Kontroll-Antikörper wurde der Anti-hNKG2D Antikörper MAB139 (R&D Systems) verwendet (Abb. 53A).

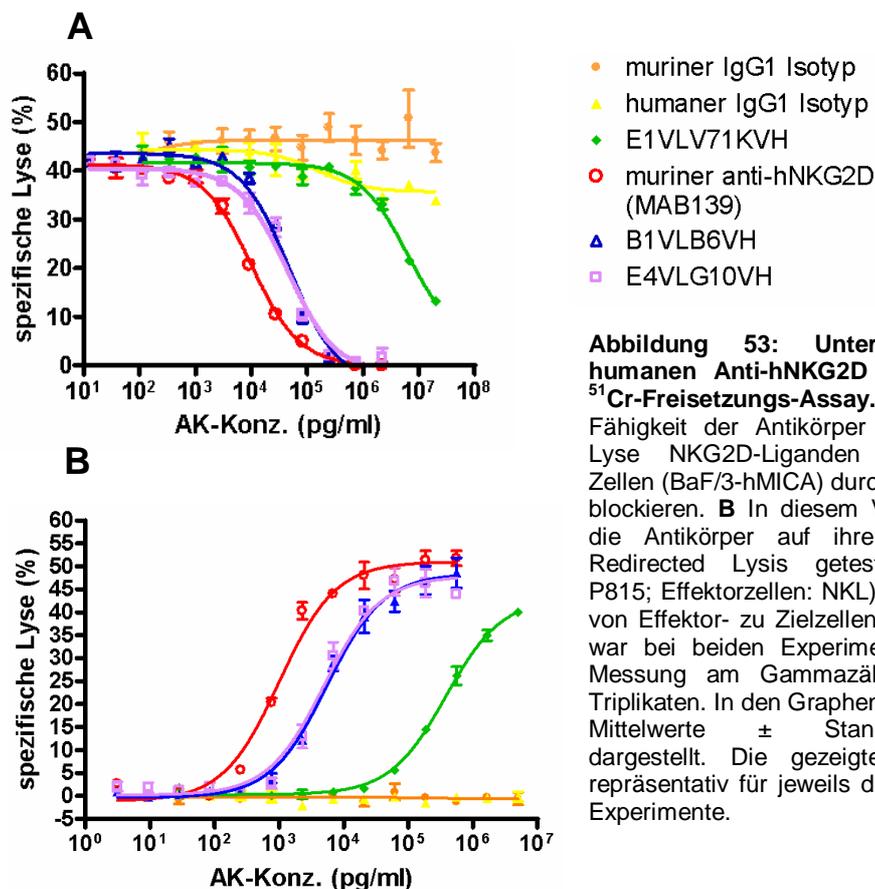


Abbildung 53: Untersuchung der humanen Anti-hNKG2D Antikörper im ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay. A Es wurde die Fähigkeit der Antikörper untersucht, die Lyse NKG2D-Liganden exprimierender Zellen (BaF/3-hMICA) durch NKL-Zellen zu blockieren. **B** In diesem Versuch wurden die Antikörper auf ihre Fähigkeit zur Redirected Lysis getestet. (Zielzellen: P815; Effektorzellen: NKL). Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen in der Kokultur war bei beiden Experimenten 40:1. Die Messung am Gammazähler erfolgte in Triplikaten. In den Graphen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Bindungsstudien mittels FACS und Biacore wurde für die affinitätsmaturierten Antikörper und den Kontroll-Antikörper (MAB139) eine

niedrigere Anfangskonzentration von 2,2 µg/ml im Gegensatz zu 20 µg/ml für den humanen E1VLV71KVH-Antikörper gewählt. Die Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH zeigten nach der Affinitätsmaturierung gegenüber ihrem ursprünglichen Ausgangskonstrukt E1VLV71KVH eine deutlich verbesserte Fähigkeit, die NKG2D-vermittelte Zellyse zu inhibieren. Vergleicht man die bei diesen Versuchen generierten IC50-Werte, d.h. die Konzentration eines Antikörpers, bei der die NKG2D-vermittelte Lyse um 50% inhibiert wird, so lässt sich bei den affinitätsmaturierten Antikörpern eine Steigerung des Inhibierungspotentials um den Faktor 100 feststellen (Tab. 9).

Tabelle 9: IC50- und EC50-Werte unterschiedlicher Anti-hNKG2D Antikörper. Der IC50-Wert (Wert, bei dem 50% der Zielzellyse durch den Antikörper inhibiert werden) wurde aus drei unabhängigen ⁵¹Cr-Freisetzungsexperimenten ermittelt, bei denen die Blockierungseigenschaften der Antikörper in der Kokultur von NKL- und BaF/3-hMICA Zellen getestet wurden. Der EC50-Wert, bei dem 50% der Zielzellen (P815) nach Zugabe eines Anti-hNKG2D Antikörpers durch die NKL-Zellen lysiert werden, wurde ebenfalls in drei unabhängigen Redirected Lysis-Experimenten gemessen. In der Tabelle sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung angegeben.

Antikörper	IC50 (µg/ml)	EC50 (µg/ml)
muriner anti-human NKG2D (MAB139, R&D Systems)	$0.95 \pm 0.48 \times 10^{-2}$	$0.89 \pm 0.18 \times 10^{-3}$
muriner 6H7	ca. 3.34 ± 1.89	$3.05 \pm 0.35 \times 10^{-2}$
humaner E1VLV71KVH	ca. 4.66 ± 2.29	$1.99 \pm 1.58 \times 10^{-1}$
humaner B1VLB6VH	$3.40 \pm 1.78 \times 10^{-2}$	$3.18 \pm 2.04 \times 10^{-3}$
humaner E4VLG10VH	$3.30 \pm 1.20 \times 10^{-2}$	$2.91 \pm 1.77 \times 10^{-3}$

Ob die Antikörper auch nach der Affinitätsmaturierung noch agonistische Eigenschaften besaßen, wurde im Zell-vermittelten Lyse-Experiment untersucht. Die NKL-Zellen wurden hierbei ebenfalls mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (E1VLV71KVH: 5 µg/ml bis 28 pg/ml oder MAB139, B1VLB6VH, E4VLG10VH: 556 ng/ml bis 3,1 pg/ml in 1:3-Verdünnungen) der Anti-hNKG2D Antikörper behandelt und anschließend zusammen mit der ⁵¹Cr-beladenen Zielzelllinie P815 kultiviert (Abb. 53B). In diesem Versuchsansatz konnte ebenfalls ein deutlich höheres Aktivierungspotential der affinitätsmaturierten Antikörper beobachtet werden. Der EC50-Wert, d.h. die Konzentration des Antikörpers, bei der 50% der Zielzellen lysiert werden, lag bei den beiden Antikörpern B1VLB6VH mit $3,18 \pm 2,04 \times 10^{-3}$ µg/ml und bei E4VLG10VH mit $2,91 \pm 1,77 \times 10^{-3}$ deutlich niedriger als bei der ersten humanen Version E1VLV71KVH mit $1,99 \pm 1,58 \times 10^{-1}$ (Tab. 9).

Die Zunahme der Affinität bei den beiden humanen Antikörpern B1VLB6VH und E4VLG10VH, die in den Bindungsstudien gezeigt werden konnte, schien sich somit auch auf deren agonistische und antagonistische Fähigkeiten auszuwirken.

4.4.6 Untersuchung der biologischen Funktionalität anhand von NKG2D-abhängigen Biomarkern

Die Ergebnisse des Genexpressionsprofils von humanen NK-Zellen nach einer hNKG2D-abhängigen Aktivierung, die mittels Microarray in Kapitel 4.1 erzielt worden waren, sollten nun als Grundlage für die Untersuchung der biologischen Funktionalität der humanen Antikörper dienen. Dazu sollten die im Microarray etablierten Biomarker, die für eine NKG2D-vermittelte Immunantwort charakteristisch sind, für die Analyse der Neutralisierungs- und Aktivierungseigenschaften der Antikörper verwendet werden.

4.4.6.1 Die humanen Antikörper können die Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren induzieren

Für die Untersuchung aktivierender Eigenschaften der humanen Anti-hNKG2D-Antikörper wurden aus PBMCs isolierte humane NK-Zellen zunächst für 2 Tage in NKL-Medium in Anwesenheit von rek. hIL-2 kultiviert. Die Analyse der Induktion einer NKG2D-abhängigen Stimulation von humanen NK-Zellen mit Hilfe der humanen Anti-hNKG2D-Antikörper (E1VLV71KVH, B1VLB6VH, E4VLG10VH) erfolgte anschließend durch deren Immobilisierung auf einer 96-Well-Platte. Das human-IgG/Fc Antikörperfragment wurde hierbei als Kontrollprotein eingesetzt (Abb. 54).

Nach einer zwanzigstündigen Stimulationsphase der humanen NK-Zellen mit den einzelnen humanen Antikörpern wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Diese wurden mittels CBA-Assay ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) und ELISA (GM-CSF) auf das Vorhandensein verschiedener löslicher proinflammatorischer Faktoren untersucht.

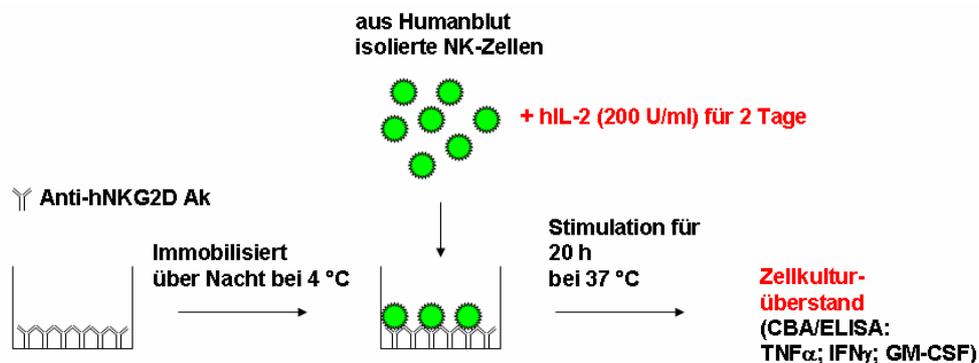


Abbildung 54: Experimentelles Design zur Untersuchung der Aktivierungseigenschaften von Anti-hNKG2D Antikörpern nach Kreuzvernetzung. Hierzu wurden NK-Zellen aus Humanblut isoliert und für 2 Tage mit hIL-2 (200 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden die NK-Zellen in eine Zellkulturplatte mit immobilisierten Anti-hNKG2D Antikörpern bzw. Isotypkontrollantikörper (je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überführt. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 20 h wurde die Zytokinmenge in den Zellkulturüberständen mittels CBA ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) und ELISA (GM-CSF) analysiert.

Für alle drei Antikörper konnte gezeigt werden, dass eine über Platten-Immobilisierung der humanen Anti-hNKG2D Antikörper herbeigeführte Kreuzvernetzung zur NKG2D-abhängigen Stimulation der Zellen führte. Diese induzierte wiederum die Freisetzung der NKG2D-spezifischen Bioindikatoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF in das Zellkulturmedium. Die von den Zellen sezernierten Zytokine wurden im Zellkulturüberstand mittels CBA oder ELISA gemessen. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des One Way Anova Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Hierbei wurde für die Induktion der Zytokinfreisetzung durch die Anti-hNKG2D Antikörper gegenüber einer Isotyp-Kontrolle ein signifikantes Ergebnis mit $p < 0,001$ beobachtet. Dieses Resultat traf auch für die Liganden-abhängige (MICAFC) Stimulation der NK-Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle (IgGFc) zu (Abb. 55A/B).

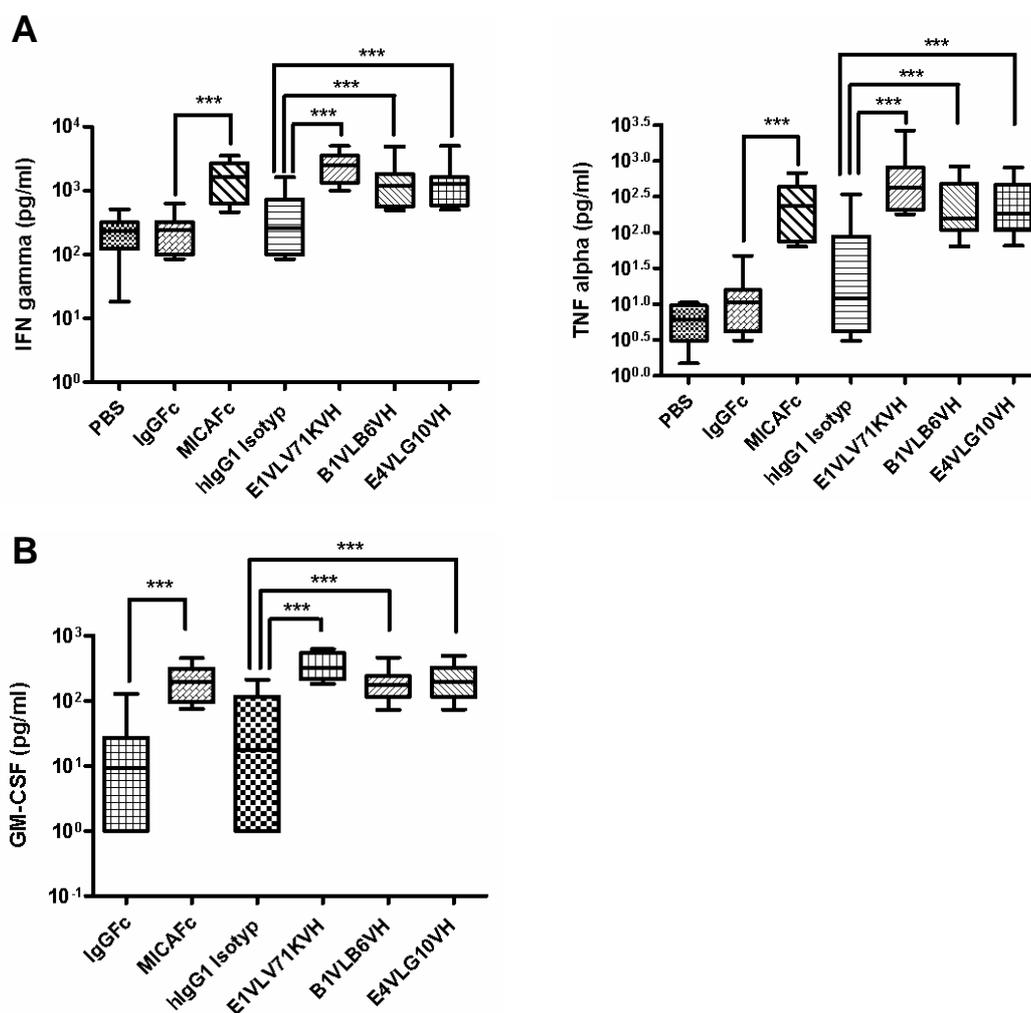


Abbildung 55: Induktion der Zytokinfreisetzung nach Kreuzvernetzung von Anti-hNKG2D Antikörpern auf humanen NK-Zellen. A/B Die Analyse der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ (A) und GM-CSF (B) in den Zellkulturüberständen mittels CBA bzw. ELISA zeigte, dass die Anti-hNKG2D Antikörper bei Kreuzvernetzung eine Stimulation der humanen NK-Zellen bewirken können. Die statistische Auswertung erfolgte über die Software GraphPad Prism. Es wurde nach Transformation (s. Text) der Daten ein One Way ANOVA Test zur Überprüfung der Signifikanz durchgeführt (Spender: $n = 8$). (***) $p < 0.001$).

Das scheinbar höhere Stimulationsvermögen des ursprünglichen humanen Konstruktes E1VLV71KVH gegenüber den beiden affinitätsmaturierten Konstrukten B1VLB6VH und E4VLG10VH war hingegen nicht signifikant. Die Daten aus der $\text{IFN}\gamma$ -Messung wurden vor dem statistischen Test über $Y = \text{Log}(Y)$ transformiert. Auch die Messergebnisse für $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF mussten vor Anwendung des One Way Anova Tests über $Y = Y + K$ mit $K = 1$ und anschließendem $Y = \text{Log}(Y)$ transformiert werden. Diese agonistischen Eigenschaften der Anti-NKG2D Antikörper ließen sich nur nach Kreuzvernetzung beobachten. Die Zugabe löslicher Anti-NKG2D Antikörper zu NK-Zellen führte nicht zu diesem Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.4.6.2 Die humanen Antikörper können eine NKG2D-induzierte Zytokinfreisetzung inhibieren

Um die Fähigkeit der Anti-hNKG2D-Antikörper zu analysieren, eine NKG2D-spezifische Stimulation der humanen NK-Zellen über MICA- bzw. ULBP-1/Fc-Protein inhibieren zu können, wurden die humanen NK-Zellen vor Zugabe in die mit NKG2D-Liganden beschichteten Platten mit unterschiedlichen Anti-hNKG2D-Antikörpern (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Medium) (E1VLV71KVH, B1VLB6VH, E4VLG10VH) oder deren Isotyp-Kontrollen für 30 min bei RT behandelt (Abb. 56).

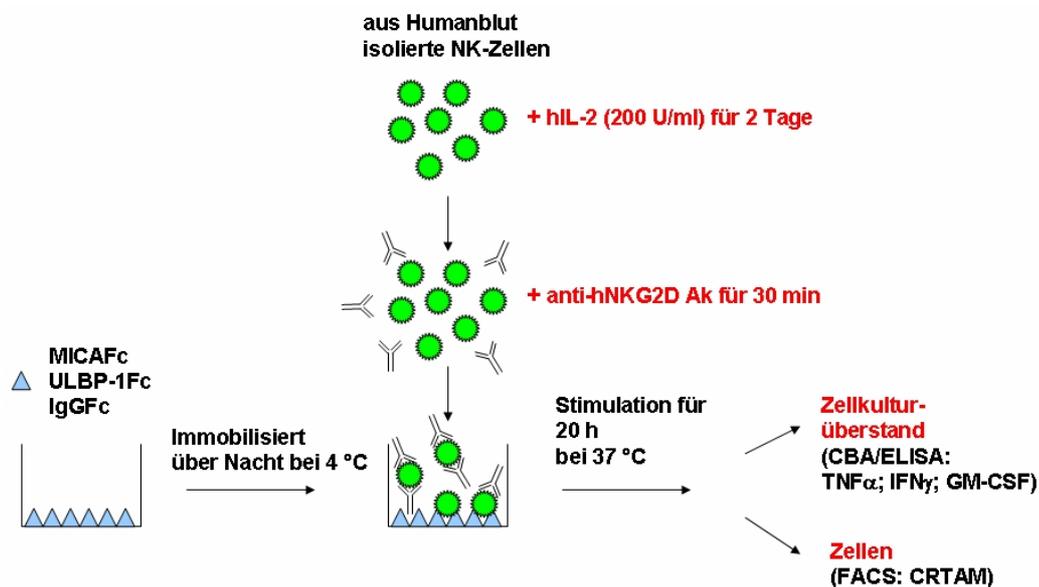


Abbildung 56: Experimentelles Design zur Untersuchung der Blockierungseigenschaften von Anti-hNKG2D Antikörpern bei Stimulation von humanen NK-Zellen mit NKG2D-Liganden. Hierzu wurden NK-Zellen aus Humanblut isoliert und für 2 Tage mit hIL-2 (200 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden die NK-Zellen für 30 min mit unterschiedlichen Anti-hNKG2D Antikörpern (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt und in Gegenwart der Antikörper in eine Zellokulturschale mit immobilisierten ULBP-1/Fc, MICA/Fc oder IgG/Fc als Negativkontrolle (je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überführt. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 20 h wurde die Zytokinfreisetzung in die Zellkulturüberstände mittels CBA ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) und ELISA (GM-CSF) analysiert. Zusätzlich wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CRTAM auf den humanen NK-Zellen im FACS überprüft.

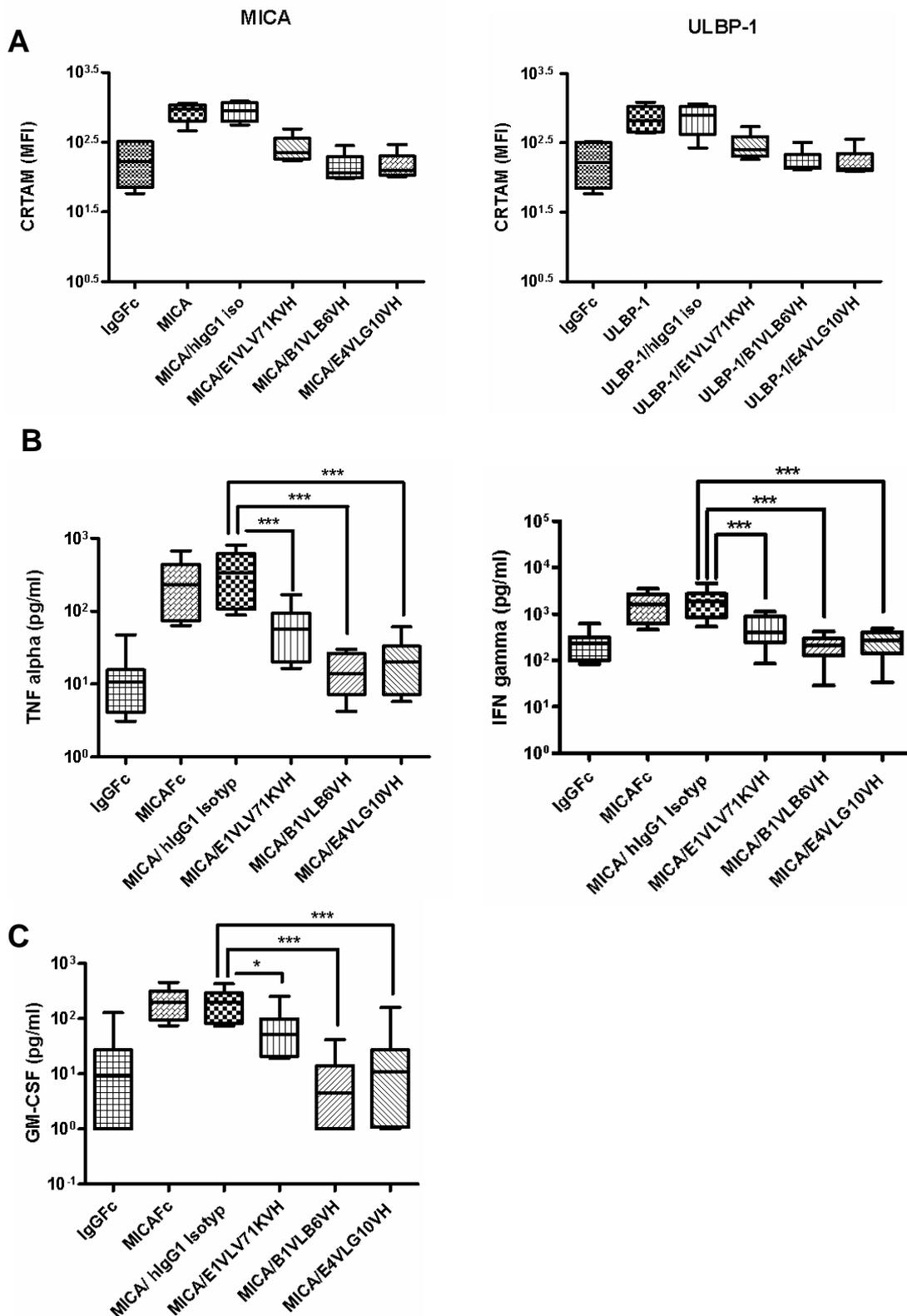


Abbildung 57: Inhibition aktivierender NKG2D-Signale durch humane Anti-hNKG2D Antikörper. **A** Die Untersuchung humaner NK-Zellen im FACS zeigte, dass eine NKG2D-abhängige Induktion des Aktivierungsmarkers CRTAM durch den Einsatz der humanen Anti-hNKG2D Antikörper (5 µg/ml) geblockt werden kann. Diese Blockierungseigenschaft der Antikörper ließ sich sowohl für den NKG2D-Liganden ULBP-1/Fc als auch für MICA/Fc bestätigen (Spender: n = 4). **B/C** Die Analyse von TNF α , IFN γ und GM-CSF in den Zellkulturüberständen mittels CBA bzw. ELISA zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Zytokine bei Behandlung der humanen NK-Zellen mit Anti-hNKG2D Antikörpern. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Zur Überprüfung der Signifikanzen wurde in B und C nach Transformation der Daten (s. Text) ein One Way ANOVA Test durchgeführt (Spender: n = 8), (* p < 0.05, *** p < 0.001).

Eine Inhibierung der CRTAM-Expression durch den Einsatz von Anti-hNKG2D Antikörpern konnte sowohl bei einer Stimulation mit dem Liganden MICA als auch mit dem Liganden ULBP-1 erreicht werden ($n = 4$). Der Einsatz einer Isotyp-Kontrolle hatte hingegen keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CRTAM (Abb. 57A).

Für die Untersuchung der neutralisierenden Eigenschaften der humanen Anti-hNKG2D Antikörper wurden neben dem Oberflächenmolekül CRTAM noch die löslichen Faktoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF als Bioindikator verwendet.

Die NKG2D-vermittelte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF konnte durch Inkubation der NK-Zellen mit den unterschiedlichen Anti-hNKG2D Antikörpern bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant reduziert werden. Hierbei zeigten die affinitätsmatürten Antikörper gegenüber dem E1VLV71KVH Konstrukt eine verbesserte Blockierungseffizienz (Abb. 57B/C). Die Signifikanz der Messergebnisse wurde nach Transformation der Daten in einem One Way ANOVA Test überprüft. Die Daten aus der $\text{IFN}\gamma$ -Messung wurden vor dem statistischen Test über $Y = \text{Log}(Y)$ transformiert. Auch die Messergebnisse für $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF mussten vor Anwendung des One Way Anova Tests über $Y = Y + K$ mit $K = 1$ und anschließendem $Y = \text{Log}(Y)$ transformiert werden.

Mit Hilfe der NKG2D-spezifischen Biomarker konnte Folgendes gezeigt werden: Der Einsatz immobilisierter Anti-hNKG2D Antikörper konnte in humanen NK-Zellen eine NKG2D-vermittelte Aktivierung und die Freisetzung der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF hervorrufen. Durch die Verwendung der gleichen Antikörper in löslicher Form konnte hingegen das Gegenteil bewirkt werden. Die Antikörper waren in der Lage, eine Interaktion zwischen dem Liganden und ihrem Rezeptor, und damit die Induktion einer NKG2D-vermittelten Signaltransduktions-Kaskade zu unterbinden. Dies führte nicht nur zu einer reduzierten Freisetzung von Zytokinen, sondern auch zu einer verringerten Expression des Oberflächenmoleküls CRTAM auf NK-Zellen.

4.4.7 Untersuchung der Internalisierung von humanen Anti-hNKG2D-Antikörpern

Wie bereits in Kapitel 1.7.3 erwähnt wurde, führt die chronische Exposition des NKG2D-Rezeptors mit löslichen als auch membrangebundenen Liganden zu dessen Internalisierung und anschließender lysosomaler Degradation. Dies hat wiederum eine Abnahme des NKG2D-Rezeptors an der Zelloberfläche und somit eine reduzierte NKG2D-vermittelte Zytotoxizität zur Folge (Groh et al., 2002; Coudert et al., 2005; Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005; Song et al., 2006). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass eventuell auch Anti-NKG2D Antikörper nach ihrer Bindung an das Antigen internalisiert werden könnten. Eine Internalisierung von Antikörpern wurde

in der Literatur z.B. für den Antikörper Efalizumab (Raptiva®), der gegen das Antigen CD11a gerichtet ist, und einen Anti-CD95 Antikörper nachgewiesen (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Coffey et al., 2004).

Für die Untersuchung einer Internalisierung der Anti-hNKG2D Antikörper nach Bindung an das Antigen im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mussten zuvor zwei der affinitätsmaturierten humanen Anti-hNKG2D-Antikörper und eine entsprechende Isotyp-Kontrolle mit einem für das CLSM geeigneten Farbstoff konjugiert werden. Für die Durchführung einer Kinetik und die anschließende Analyse der Proben am CLSM wurde ein sehr stabiler Farbstoff für die Konjugation benötigt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass dieser Farbstoff auch eine pH-unabhängige Färbung ermöglichte, da nach einer Internalisierung der Antikörper ein Transport in lysosomale Kompartimente stattfinden könnte. All diese Eigenschaften wurden vom Farbstoff Alexa-Fluor 488 erfüllt. Eine erfolgreiche Konjugation der Antikörper mit dem Farbstoff Alexa-Fluor 488 wurde zunächst mittels FACS auf NKL-Zellen überprüft (Abb. 58A/B/C).

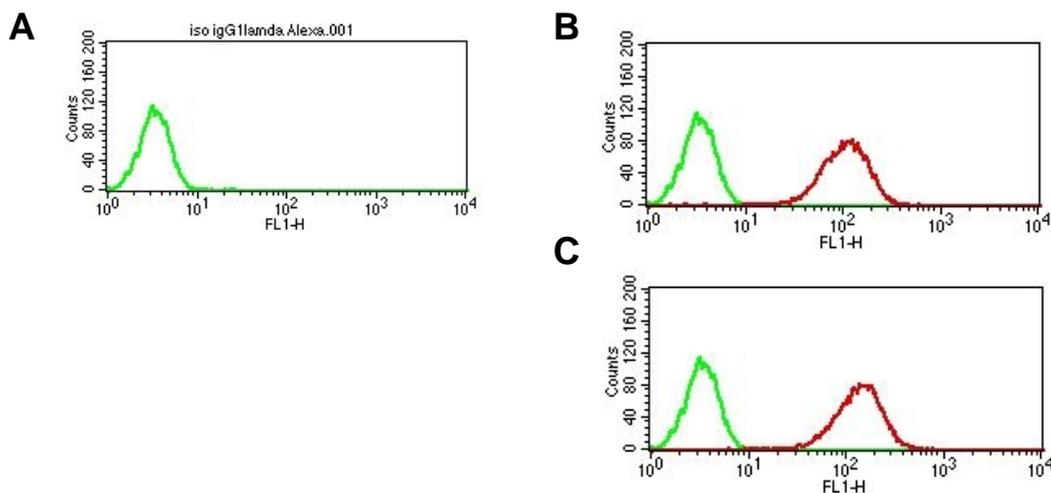


Abbildung 58: Bindung Alexa-Fluor 488 konjugierter, humaner Anti-hNKG2D Antikörper an den NKG2D-Rezeptor auf NKL-Zellen. Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit wurden die mit Alexa-Fluor 488 konjugierten humanisierten Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH (5 µg/ml) für 45 min bei 4°C mit NKL-Zellen inkubiert. **A** Bindung der Alexa-Fluor 488 konjugierten humanen IgG1λ Isotyp-Kontrolle (grün). **B** Bindung von Alexa-Fluor 488 B1VLB6VH (rot). **C** Bindung von Alexa-Fluor 488 E4VLG10VH (rot)

Es konnte mittels FACS gezeigt werden, dass die beiden Alexa-Fluor 488 konjugierten Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH spezifisch an den NKG2D-Rezeptor auf NKL-Zellen binden konnten (Abb. 58B/C), während für die Alexa-Fluor 488 konjugierte Isotyp-Kontrolle keine Färbung der Zellen detektiert werden konnte (Abb. 58A).

Für die Analyse einer Antikörper-Internalisierung durch NK-Zellen nach Bindung an den NKG2D-Rezeptor wurde eine Kinetikstudie durchgeführt. Mit Hilfe der Kinetik konnte die Färbung des NKG2D-Rezeptors auf NKL-Zellen und somit auch die Verteilung der humanen Alexa 488-konjugierten Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH

nach unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten (0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) analysiert werden. Um eine intrazelluläre Lokalisation der Antikörper besser feststellen zu können, wurden die Zellkerne der NKL-Zellen zusätzlich mit DAPI angefärbt. Die unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte wurden schließlich unter dem CLSM (Leica) mit der passenden Software analysiert und die Bilder über die Grafiksoftware Amira 3.1.1 (Visage Imaging) ausgewertet. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biologin Christina Zube, einer Doktorandin der Arbeitsgruppe Rössler am Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie (Zoologie II) des Biozentrums der Universität Würzburg.

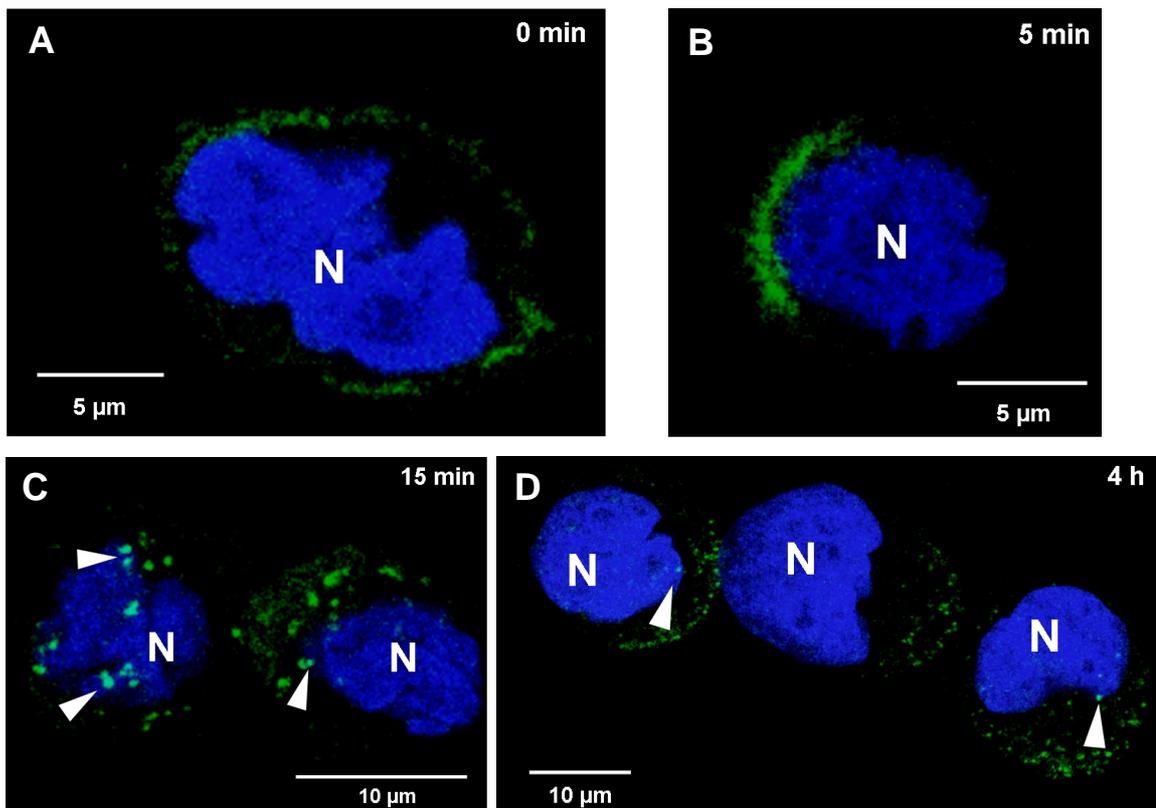


Abbildung 59: Internalisierung humaner Anti-hNKG2D Antikörper nach Bindung an den NKG2D-Rezeptor auf NKL-Zellen. Zur Überprüfung der Internalisierung wurden die mit Alexa Fluor 488 konjugierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH (5 µg/ml) zunächst für 45 min bei 4°C mit NKL-Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die antikörperbeladenen NKL-Zellen unterschiedlich lange bei 37°C kultiviert (0 min – 4 h). Nach Fixierung und Permeabilisierung der NKL-Zellen wurde der Zellkern (N) mit DAPI gegengefärbt. **A-D** Konfokale Laserscanning mikroskopische Aufnahmen (Leica TCS SP2 AOBS) der NKG2D-Färbung (grün) und DAPI-Färbung (blau) von NKL-Zellen nach 0, 5, 15 min und 4 h. Auswertung der Aufnahmen mit der Software Amira 3.1.1. Schnittdicke 0.2 µm; 63x Objektiv HCX PL APO 1.4 oil; weiße Pfeile: Internalisierte Anti-hNKG2D-Antikörper.

Zum Zeitpunkt 0 lagen beide humanen Antikörper auf der gesamten Zelloberfläche clusterförmig verteilt vor, während die Isotyp-Kontrolle keine Färbung zeigte (Abb. 59A). Bereits nach 5 min konnte jedoch schon bei einem Großteil der Zellen eine Clusterbildung der Antikörper an einem der Zellpole festgestellt werden (Abb. 59B).

Nach 15 min konnte bei den beiden Anti-hNKG2D Antikörpern eine vesikelförmige Internalisierung in das Zytoplasma der NKL-Zelle festgestellt werden (Abb. 59C), welche sich auch noch nach vier Stunden nachweisen ließ (Abb. 59D). Allerdings konnten bei dieser Färbung keine Aussagen darüber getroffen werden, ob nach vier Stunden bereits ein Übergang der Antikörper-haltigen Vesikel in das lysosomale System stattgefunden hatte.

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass nach einer Interaktion der humanen Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH mit dem NKG2D-Rezeptor, ähnlich wie bei der Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden, eine Internalisierung von NKG2D und den daran gebundenen Antikörpern erfolgt.

5. Diskussion

Bei dem Oberflächenprotein NKG2D handelt es sich um einen sehr gut charakterisierten, aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Seine biologische Funktionalität spielt nicht nur bei der Immunabwehr von Tumoren oder virusinfizierten Zellen, sondern auch bei der Entstehung von Autoimmunität eine zentrale Rolle. Aufgrund dieser Tatsache ist eine weitere Erforschung dieses Rezeptors von potentiell klinischer Relevanz. So könnte z.B. eine immuntherapeutische Blockade von NKG2D bei einer Behandlung von Autoimmunerkrankungen hilfreich sein, während eine zusätzliche Anregung der NKG2D-Aktivität hingegen die Immunantwort gegenüber Krebs oder Infektionen stärken könnte. Eine mögliche Therapieform könnte hierbei die Verwendung NKG2D-spezifischer Antikörper darstellen. Der Einsatz neutralisierender Anti-NKG2D Antikörper hatte in verschiedenen Modellsystemen von Autoimmunerkrankungen bereits eine therapeutische Wirksamkeit gezeigt (Ogasawara et al., 2004; Kjellev et al., 2007; Saikali et al., 2007; Lopez-Larrea et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen ein gegen NKG2D gerichteter humaner Antikörper entwickelt werden. Weiterhin sollten zur Etablierung von NKG2D-spezifischen Biomarkern, welche die Charakterisierung der neutralisierenden Antikörper erleichtern können, Genexpressionsprofile von ULBP-1Fc stimulierten humanen NK-Zellen erstellt werden.

5.1 NKG2D-vermittelte Genexpression

Für die Entwicklung zuverlässiger NKG2D-abhängiger Behandlungsmethoden sind weitere Erkenntnisse für ein besseres Verständnis der Mechanismen notwendig, welche die Funktion des NKG2D-Rezeptors, dessen Expression und Signaltransduktion regulieren.

Vor Beginn dieser Dissertation konnten bereits in verschiedenen Studien einige Erkenntnisse über die intrazellulären Abläufe bei einer Signaltransduktion nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors gewonnen werden (Wu et al., 1999b; Colucci et al., 2002; Long, 2002; Billadeau et al., 2003; Cella et al., 2004; Vivier et al., 2004). Chen und Kollegen (2007) hatten kürzlich gezeigt, dass nach der Bindung der Liganden an den Rezeptor Kinasen der Src Familie die Aktivierung zweier Signaltransduktionswege, des PI3K/ERK2- und des PLC γ /JNK1-Weg, initiieren. Eine Kreuzvernetzung des NKG2D-Rezeptors führt hierbei zur Phosphorylierung von ERK2 und JNK1 (Chen et al., 2007). Der PI3K-Signalweg wird nach der Tyrosin-Phosphorylierung des DAP10 durch die Bindung und Aktivierung der p85 Untereinheit der PI3K eingeleitet (Wu et al., 1999b).

Die nachfolgende Rekrutierung der PI3K führt zur Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 (Vivier et al., 2004). Die p21-aktivierte Kinase (PAK1) und die Mitogen-aktivierten oder durch extrazelluläre Signale regulierten Protein-Kinasen (MEK) leiten schließlich eine sequentielle Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) ERK ein (Sutherland et al., 2002; Cella et al., 2004; Meresse et al., 2004; Vivier et al., 2004). Wie p85 kann auch Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) direkt an phosphoryliertes DAP10 binden (Upshaw et al., 2006). Das Adapterprotein Grb2 interagiert hierbei mit dem Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Vav1. Dieser Grb2-Vav1-Komplex initiiert die Phosphorylierung von Vav1 und die anschließende Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) (Upshaw et al., 2006). Dies führt wiederum über die Kinasen MKK zur Aktivierung von JNK (Meresse et al., 2004; Nausch et al., 2006; Chen et al., 2007). All diese Signalwege haben letztendlich in der NK-Zelle eine Reorganisation des Zytoskeletts, eine Polarisierung der zytotoxischen Granula, die Freisetzung von Perforin und Granzym in die immunologische Synapse und möglicherweise die Freisetzung von Zytokinen zur Folge (Vivier et al., 2004; Chen et al., 2007; Li et al., 2008).

In einigen Publikationen konnte bereits sowohl im Mausmodell als auch im Humansystem gezeigt werden, dass eine chronische Exposition von NK-Zellen mit NKG2D-Liganden tragenden Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* zu einer reduzierten NKG2D-vermittelten Immunantwort führt (Groh et al., 2002; Coudert et al., 2005; Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005; Song et al., 2006). Die Mechanismen dieses Phänomens sind bisher nur unzureichend geklärt. Eine mögliche Ursache ist hierbei die Internalisierung des Rezeptors nach Interaktion mit seinen Liganden.

Die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarray-Studien mit NKG2D-Liganden stimulierten humanen NK-Zellen lassen vermuten, dass es sich hierbei möglicherweise um einen komplexeren Vorgang handelt, an dem mehrere Mechanismen beteiligt sind.

5.1.1 Eine ULBP-1Fc Stimulation induziert in humanen NK-Zellen sowohl positive als auch negative Regulationsmechanismen

Die Ergebnisse des in Kapitel 4.1 beschriebenen Genexpressionsprofils humaner NK-Zellen zeigen, dass nach Stimulation mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc ausschließlich eine Induktion aber nicht Inhibition der Expression bestimmter Gene in der Zelle stattfindet. Hierbei handelte es sich vor allem um intrazelluläre Regulatoren der Zellfunktion. Einige dieser Faktoren ließen sich aufgrund ihrer aus der Literatur bekannten Eigenschaften gut in das bereits ermittelte Schema einer NKG2D-vermittelten Signaltransduktion einfügen (Abb. 60).

wird. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum wird hierbei durch das lösliche Inositol-triphosphat (IP₃) induziert, das nach Aktivierung der PLC γ bei der Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) in (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) entsteht (Abb. 60). Phospholipase C Aktivierung und Ca^{2+} -Mobilisierung sind die ersten Schritte, die zu einer Perforin-abhängigen Zytotoxizität von NK-Zellen führen (Bryceson et al., 2006b). Eine Induktion von Cox2 hätte demzufolge für die humane NK-Zelle einen positiven Effekt auf deren Zellaktivität und Proliferation.

BCL2A1 wurde in den NK-Zellen aller vier Spender dreifach hochreguliert. Es besitzt ähnlich wie BCL2 ebenfalls eine Anti-apoptotische Aktivität (Lin et al., 1996). Die Induktion von BCL2A1 erfolgt über den NF κ B-Signaltransduktionsweg. BCL2A1 bindet in den Mitochondrien an tBid, die aktive Form des proapoptotischen Proteins Bid, und verhindert dadurch die Interaktion zwischen tBid und Bax oder Bak und somit eine apoptogene Aktivität der Mitochondrien (Werner et al., 2002; Simmons et al., 2008).

Für MAP3K8 (Mitogen-Activated Kinase Kinase Kinase 8) wurde in den ULBP-1Fc stimulierten humanen NK-Zellen eine dreifach höhere Menge an Transkripten detektiert. Bei T-Lymphozyten konnte bereits während des Übergangs von G₀ nach G₁ eine ansteigende Transkription der MAP3K8 festgestellt werden, welches eine Funktion dieser Kinase im späteren Verlauf des Zellzyklus vermuten lässt (Velasco-Sampayo & Alemany, 2001). Da die Expression dieser Kinase zur Phosphorylierung von c-Jun und ERK1/2 führt, folgert man, dass MAP3K8 ein direkter Aktivator von MEK-1 ist (Hagemann et al., 1999). MAP3K8 aktiviert den nuklearen Faktor NFAT (Nuclear Factor of Activated T-Cells) und induziert somit die Expression von IL-2 in T-Zelllinien (Tsatsanis et al., 1998). In humanen NK-Zellen ist NFAT als einer von vielen Transkriptionsfaktoren von IFN γ , TNF α , IL-3 und GM-CSF bekannt.

Diese drei zuvor genannten NKG2D-initiierten regulatorischen Faktoren, Cox2, BCL2A1 und MAP3K8 könnten aufgrund ihrer Eigenschaften einen positiven Effekt sowohl für NK-Zellvitalität und -aktivität als auch Proliferation darstellen. Dies könnte die NK-Zell-vermittelte Immunantwort im Falle einer Tumorbekämpfung stärken. Bei Autoimmunerkrankungen würde eine ausschließliche Induktion dieser Gene jedoch sehr wahrscheinlich zur Verstärkung der Symptomatik führen. Aus diesem Grund führt eine Stimulation des NKG2D-Rezeptors möglicherweise auch zu einer baldigen Induktion negativer Regulatoren, die neben anderen Mechanismen eine Abnahme der NK-Zellaktivität bei chronischer Exposition mit NKG2D-Liganden bewirken könnten.

So wurde z.B. CIAS1 (Cold-Induced Autoinflammatory Syndrom 1), auch als NALP3 oder Cryopyrin bekannt, dreifach stärker von ULBP-1Fc stimulierten NK-Zellen transkribiert. Es handelt sich hierbei um ein Signalprotein, das an der Regulation der Apoptose beteiligt ist (Hoffman et al., 2001). Die Genexpression von CIAS1 kann durch

TNF α oder die Bindung von Mitogenen an die entsprechenden Toll-like Rezeptoren induziert werden. Es gehört zu der CATERPILLER (CARD (Caspase Recruitment Domain), Transcription Enhancer, R (purine)-binding, Pysin, Lots of Leucine Repeats)-Gen-Familie, deren Proteine wahrscheinlich bei der Regulation von Zytokinen, von inflammatorischen Immunantworten, NF κ B-Aktivierung und Zellvitalität eine Rolle spielen (Ting & Williams, 2005). Nach Induktion der CIAS1 Genexpression durch TNF α erfolgt ein negativer Feedback-Loop, in dem CIAS als Inhibitor der TNF α -induzierten NF κ B-Aktivität fungiert (O'Connor et al., 2003). Dies stellt einen wichtigen Mechanismus dar, die eingeleitete Inflammationsreaktion zu stoppen und somit einer irreparablen Gewebeerstörung entgegen zu wirken.

Die mRNA von RGS16 (Regulator of G-Protein Signaling) war in der Microarray-Studie dreifach stärker exprimiert. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Expression von RGS16 infolge einer Aktivierung durch Mitogene induziert wird. Eine Überexpression von RGS16 führt sowohl zur Inhibierung der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion als auch der MAPK-Signalkaskade (Buckbinder et al., 1997). Neuere Studien lassen sogar vermuten, dass RGS16 möglicherweise als negativer Regulator der Chemokin-induzierten Migration von Lymphozyten fungiert (Berthebaud et al., 2005). Für eine Aktivierung des Ly49A-Rezeptors auf NK-Zellen konnte ebenfalls ein Anstieg der mRNA von RGS16 festgestellt werden (Kveberg et al., 2005). Dies könnte daraufhin deuten, dass RGS-Proteine bei der Signaltransduktion durch NK-Zell-Rezeptoren eine Rolle spielen und in den NK-Zellen eine Vernetzung zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und NK-Zellrezeptoren stattfindet.

Eine neuere Studie von Coudert und Kollegen (2008) lässt in diesem Zusammenhang sogar vermuten, dass eine anhaltende Aktivierung des NKG2D-Rezeptors auch zu einer Toleranz verschiedener nicht verwandter aktivierender NK-Zell-Rezeptoren führt. Diese Beobachtung wird in der Literatur auch als Kreuztoleranz bezeichnet. Eine chronische NKG2D Stimulation stört hiermit sowohl eine Erkennung von Tumorzellen über Missing-Self als auch die Funktion der aktivierenden Rezeptoren CD16 (ADCC), NK1.1 und NKp46. Während einer Infektion könnte diese Kreuztoleranz mit einem transientem Abbruch der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen möglicherweise einer limitierenden Gewebeerstörung dienen. Eine anhaltende Aktivierung des NKG2D-Rezeptors beeinträchtigt außerdem die Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺. Dies könnte die Ursache für eine abnehmende Freisetzung von Granzym B und Perforin aus den zytotoxischen Granula sein, was im Endeffekt ebenfalls zu einer herabgesetzten NK-Zell-Zytotoxizität führt.

In diesem Zusammenhang könnte möglicherweise das RRAD-Gen (Ras-Related Associated with Diabetes) fungieren, das in humanen NK-Zellen vierfach stärker

transkribiert wurde. RRAD ist ein GTP-bindendes Protein, das ähnlich wie Ras als GTPase fungiert. Es kann von verschiedenen Kinasen wie PKA bzw. PKC aktiviert werden und ist sehr wahrscheinlich an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt. RRAD könnte somit ein Regulator der NKG2D-induzierten Polarisierung des Mikrotubuli-Organisations-Zentrums (MTOC) und der zytotoxischen Granula darstellen. Die Ergebnisse von Finlin und Kollegen (2003) deuten daraufhin, dass RRAD durch direkte Interaktion mit der beta-Untereinheit die Aktivität des L-Typ Ca^{2+} -Kanals inhibiert. Da die Exozytose der zytotoxischen Granula abhängig ist von einer intrazellulären Mobilisierung von Calcium (Coudert et al., 2005), könnte RRAD diese negativ regulieren.

Die Ergebnisse von Coudert und Kollegen (2008) lassen vermuten, dass eine anhaltende NKG2D Stimulation die zytoplasmatische Signaltransduktion unterhalb des $\text{Fc}\gamma$ beeinflusst. Hierbei könnten Vav-1 und noch weitere Rezeptoren eine Rolle spielen, die PI3K aktivieren und somit einer NK-Zell vermittelten Lyse induzieren (Cella et al., 2004). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass eine chronische Stimulation von NKG2D die Zellgröße und die Expansion von NK-Zellen reduziert, die mit IL-2 kultiviert werden (Coudert et al., 2005).

Diese Effekte werden möglicherweise durch die Induktion der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitoren SPRY1 und SPRY2 (SPROUTY) beeinflusst. Diese verlagern sich nach EGF-Stimulation an Membranausstülpungen. Nach Stimulation mit ULBP-1Fc konnte in humanen NK-Zellen mittels vorliegender Microarray-Analyse eine zwei- bzw. sechsfach verstärkte Expression von SPRY1/2 festgestellt werden. Beide Proteine hemmen nach Überexpression das Zellwachstum, indem sie die Aktivierung des c-fos Gens, das für DNA-Synthese und Zellteilung benötigt wird, verhindern (Gross et al., 2001). Außerdem hemmen sie nach ihrer Überexpression die Ras Aktivierung und somit die Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktion. Weiterhin bindet phosphoryliertes SPRY an Grb2 (Hanafusa et al., 2002). Ein Regulator von SPRY1/2 ist SHP-2, das beide Proteine durch Dephosphorylierung inaktiviert und somit den RTK-Signalweg positiv beeinflusst (Hanafusa et al., 2004).

EGR1 (Early Growth Response 1), das siebenfach stärker nach NKG2D-Stimulation transkribiert worden war, inhibiert ebenfalls das Zellwachstum, aber auch Zelltransformation und Apoptose (Liu et al., 1998). Es blockiert die Fas-Expression auf Tumorzellen und bewirkt somit eine Desensibilisierung gegenüber dem Apoptose-induzierenden Fas-Liganden (Virolle et al., 2003). EGR1/4 und NFAT scheinen einen Komplex auszubilden, der in T-Zellen die Expression von IL-2 und $\text{TNF}\alpha$ steuert (Decker et al., 2003).

EGR3, das in der Microarray-Analyse von humanen NK-Zellen nach ULBP-1Fc-Stimulation eine 26-fach stärkere Expression zeigte, ist bereits in T-Zellen als negativer

Regulator der T-Zell-Aktivität und für die Einleitung einer T-Zell-Anergie bekannt (Safford et al., 2005). Die beiden Zinkfinger-Proteine EGR3 und EGR4 interagieren in T-Zellen mit NF κ B p50/p65 und kontrollieren auf diese Weise die Transkription der Gene von proinflammatorischen Zytokinen (Wieland et al., 2005). Somit könnten EGRs auch in humanen NK-Zellen nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors sowohl eine Rolle bei der Transkription von proinflammatorischen Zytokinen als auch beim Abschalten der NK-Zell-Zytotoxizität spielen.

BTG2 (B-Cell Translocation Gene) könnte ebenfalls ein Faktor eines negativen Feedback-Loops sein. Es ist ein p53 Zielgen, das antiproliferative Eigenschaften besitzt und eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und einer zellulären Antwort auf DNA-Beschädigung spielt (Rouault et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte nach Stimulation mit ULBP-1Fc eine zweifach stärkere Transkription dieses Gens festgestellt werden. Die Expression des BTG2-Gens kann infolge einer DNA-Beschädigung, einer Zelldifferenzierung, eines Zellkontakts oder einer Zellanergie ansteigen (Melamed et al., 2002). Durch Inhibierung der Ausbildung des Cyclin B1 – Cdc2-Komplexes induziert BTG2 einen G2/M-Arrest und Apoptose (Ryu et al., 2004).

Weiterhin könnten auch die DUSP2/5/6 (Dual-Specificity Phosphatases) in humanen NK-Zellen negativ regulatorisch wirken. Sie werden nach ULBP-1Fc-Stimulation dreifach stärker als mRNA von NK-Zellen exprimiert. Sie sind für eine Dephosphorylierung der MAPK und ERK1/2 verantwortlich (Groom et al., 1996; Yin et al., 2003) und könnten somit für den Abbruch einer weiteren NKG2D-Signaltransduktion verantwortlich sein.

Die Gene für NR4A (Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A) wurden in stimulierten humanen NK-Zellen drei- bis 20-fach stärker exprimiert. Ihre Expression wird durch NF κ B induziert. Nach Interaktion von NR4A-Proteinen mit Bcl-2 wird Apoptose induziert (Lin et al., 2004).

All diese aufgezählten Faktoren könnten nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors negativ regulierend in die Signaltransduktionskaskade eingreifen und somit einer anhaltenden, unkontrollierten Gewebeerstörung durch zytotoxisch aktive NK-Zellen entgegen wirken.

Es konnte in einer anderen Studie aber auch gezeigt werden, dass die Anergie des aktivierenden NKG2D-Rezeptors kein permanenter Zustand ist. Lediglich eine kontinuierliche Exposition mit NKG2D-Liganden hält den inaktiven Zustand der NK-Zellen aufrecht (Coudert et al., 2008).

Bhat und Watzl (2007) konnten zudem zeigen, dass IL-2 aktivierte humane NK-Zellen zu einer seriellen Lyse mehrerer Zielzellen fähig sind. Dieses sogenannte Serial Killing führt in der NK-Zelle zu einem Verlust an Perforin und Granzym B. Dieser ist nicht

komplett, so dass zusätzliche Mechanismen für die vollständige Inaktivierung von NK-Zellen erforderlich sind. Die Daten der vorliegenden Microarray-Analyse bestätigen diesen Aspekt. So kann davon ausgegangen werden, dass für die Reduktion der NK-Zellaktivität aufgrund konstanter Stimulation neben der Abnahme aktivierender Rezeptoren auf der Zelloberfläche auch intrazelluläre Schritte der Inaktivierung der Signaltransduktionswege verantwortlich sind. Eine Kultivierung der in Anergie verfallenen NK-Zellen mit IL-2 bewirkt die Wiederherstellung des Vorrats zytotoxischer Granula und somit die Regeneration inaktiver NK-Zellen (Bhat & Watzl, 2007). Horng und Kollegen (2007) konnten in diesem Zusammenhang eine direkte Verknüpfung zwischen den Signaltransduktionswegen von NKG2D/DAP10 und IL-2/IL-15-Rezeptor bei NK-Zellen nachweisen.

Die anhand der Microarray-Studie ermittelten NKG2D-induzierten intrazellulären Regulatoren könnten ein Ansatzpunkt für die weitere Erforschung des Signaltransduktionweges und die Mechanismen sein, die für den Wechsel von NK-Zell-Aktivierung zu NK-Zell-Toleranz verantwortlich sind. Hierbei ist zu beachten, dass in diesem Fall zunächst auch eine Verifizierung der Faktoren auf Proteinebene notwendig wäre.

5.1.2 Die Stimulation von NKG2D mit ULBP-1Fc führt zu einem Anstieg der Expression bestimmter membranständiger Aktivierungsmarker

Für die Charakterisierung von Anti-hNKG2D Antikörpern sollten anhand der Microarray-Studie jedoch hauptsächlich NKG2D-abhängige extrazelluläre Faktoren wie Membranproteine oder lösliche Faktoren wie Zytokine oder Chemokine als Biomarker identifiziert werden, da diese sich mit einfachen Methoden wie FACS, ELISA oder CBA detektieren lassen. Hierbei konnten auf mRNA-Ebene folgende NKG2D-abhängigen Membranproteine analysiert werden: LIGHT (TNFSF14), BY55 (CD160), GPR18, FasL (CD178) und CRTAM.

LIGHT (TNFSF14) ist ein relativ neues Mitglied der TNF-Familie membranständiger Liganden. Es kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden, den HVEM (Herpesvirus Entry Mediator) und den LT β R (Lymphotoxin Receptor β). Der HVEM-Rezeptor befindet sich auf T-Zellen und NK-Zellen, der LT β R auf Stromazellen. Die LIGHT-LT β R-Interaktion kann die Expansion von DCs für eine T-Zell-vermittelte Immunität anregen (Wang et al., 2005). LIGHT kann nach Aktivierung von T-Zellen auf deren Oberfläche transient exprimiert werden. Es scheint auch bei der Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen und bei der Interaktion von aktivierten NK-Zellen mit CD8⁺-T-Zellen eine Rolle zu spielen (Fan et al., 2006). Es ist möglicherweise an der Pathogenese der RA beteiligt, indem es die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induziert (Ware, 2001; Kim et al., 2005).

Das Membranprotein TNFS14 wurde nach ULBP-1Fc-Stimulation dreifach stärker transkribiert. Ein Anstieg in der Expression konnte jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Eine Studie von Wendt und Kollegen (2006) hingegen konnte nach Aktivierung humaner NK-Zellen mit PMA/Ionomycin für 48 Stunden TNFS14 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene mit Hilfe einer Protein-Array-Analyse nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte auch während der Kinetik bei 48 Stunden kein Anstieg der Expression dieses Membranproteins festgestellt werden. Daher wurde unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die beiden Biomarker TNF α und CRTAM zwar sehr bald nach der Aktivierung von den NK-Zellen gebildet werden, ihre Expression allerdings bereits nach 48-72 Stunden abgeschwächt wird (Fuchs & Colonna, 2006; Wendt et al., 2006), für alle Proteine der Messzeitpunkt auf 24 Stunden nach Stimulation festgelegt. Die Unterschiede der erhaltenen Daten könnten somit auf die Verwendung unterschiedlicher Stimuli und unterschiedlich lange Inkubationszeiten zurückgeführt werden.

BY55/CD160 ist ein GPI-verankertes Oberflächenprotein, das hauptsächlich von intestinalen intraepithelialen Lymphozyten und einem geringen Teil zirkulierender Lymphozyten (NK, $\gamma\delta$ T-Zellen, CTLs) exprimiert wird (Nikolova et al., 2002). Er ist als Korezeptor bei der T-Zell-Aktivierung von Bedeutung und bindet an MHC-Klasse-I a/b-Moleküle. Von CD160 ist auch bekannt, dass es von CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen exprimiert wird (Anumanthan et al., 1998). Bei einer Stimulation mit ULBP-1Fc wurde CD160 gegenüber der Negativkontrolle in humanen NK-Zellen zweifach stärker transkribiert. Allerdings konnte für dieses Oberflächenprotein keine verstärkte Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Für CD160 konnten Wendt und Kollegen (2006) in ihrer Studie nach einer Stimulation von 48 Stunden mit PMA und Ionomycin bei CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen eine erhöhte Genexpression feststellen.

Bei GPR18 handelt es sich um einen neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Über die Funktion des Rezeptors ist bisher nur wenig bekannt (Gantz et al., 1997). Das Gen für diesen Rezeptor wurde nach ULBP-1Fc-Stimulation zweifach stärker transkribiert, konnte jedoch auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

FasL (CD178) ist ein Typ II Transmembranprotein und gehört zur TNF-Familie. Es bindet an den Rezeptor Fas (bzw. APT1, CD95, Apo-1) und induziert infolge der Interaktion die Apoptose der Rezeptor tragenden Zelle. Es kommt auch in löslicher Form vor (Suda et al., 1993). Die Transkription von FasL war in humanen NK-Zellen nach Induktion der NKG2D-Aktivität um den Faktor zwei erhöht. Eine Detektion auf Proteinebene war allerdings nicht möglich.

Die Beobachtung, dass bestimmte Membranproteine nach ULBP-1Fc-Stimulation zwar im Microarray stärker transkribiert waren, aber keine verstärkte Proteinexpression

nachgewiesen werden konnte, bestätigt die Tatsache, dass aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten und Translationshäufigkeiten von mRNA kein linearer Zusammenhang zwischen ihrem Vorkommen und der Anzahl der vorhandenen Proteine hergestellt werden kann.

Für das Oberflächenprotein CRTAM hingegen, das nach einer NKG2D-induzierten Aktivierung mit einer Abweichung von 3,2 im Microarray am stärksten von den NK-Zellen hochreguliert war, konnte auch auf Proteinebene eine verstärkte Expression beobachtet werden. CRTAM kann auf aktivierten NKT-Zellen, NK-Zellen und CTLs nachgewiesen werden (Kennedy et al., 2000; Arase et al., 2005). Die Expression auf aktivierten NK-Zellen und CTLs ist transient und beginnt sich nach 72 h abzuschwächen (Fuchs & Colonna, 2006). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit im Laufe der Vorversuche anhand einer Kinetik ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Sein Ligand ist Necl-2 (Nectin like 2), das an der Ausbildung epithelialer Zellverbände beteiligt ist. Die Interaktion zwischen CRTAM und Necl-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration von NK-Zellen und CTLs nach ihrer Stimulation und fördern die Zytotoxizität von NK-Zellen und die Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ durch CTLs. NK-Zellen können über CRTAM Necl-2 exprimierende Tumorzellen erkennen. Necl-2 kann auf einer bestimmten Population humaner und muriner DCs nachgewiesen werden und reguliert bei der Interaktion mit CTLs die IL-22 Produktion (Boles et al., 2005; Fuchs & Colonna, 2006). Boles und Kollegen (2005) hatten bereits in einer Studie zeigen können, dass nach einer vierstündigen Stimulation mit PMA/Ionomycin oder nach Übernachtskultur mit bestimmten Tumorzelllinien (MZ2, A549 oder K562) die Oberflächenexpression von CRTAM bei humanen NK-Zellen induziert wird. Auch die Aktivierung humaner NK-Zellen über Anti-CD16 oder Anti-NKp30 Antikörper führen zu einer Expression von CRTAM auf der NK-Zell-Oberfläche. Dieses Ergebnis kann jedoch durch den Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers nicht erzielt werden (Boles et al., 2005). Da es sich bei der Tumorzelllinie K562 um ULBP-1 und ULBP-2 tragende Zellen handelt, lassen sich die erhaltenen Daten der Stimulation mit löslichem ULBP-1Fc mit den Ergebnissen von Boles (2005) gut vergleichen. Den bekannten Eigenschaften von CRTAM zufolge könnte dessen Expression bei der Bekämpfung von Tumorzellen durch humane NK-Zellen deren immunologische Synapse stabilisieren und somit deren zytotoxische Aktivität unterstützen. Möglicherweise spielt dieses Membranprotein auf NK-Zellen auch eine Rolle bei der Vernetzung von angeborener und adaptiver Immunantwort, indem die NK-Zellen über CRTAM mit Necl-2 auf DCs in Interaktion treten könnten.

Ob und wie CRTAM die NK-Zell-Zytotoxizität und die Interaktion mit anderen immunregulatorischen Zellen beeinflusst, wurde im Laufe dieser Dissertation nicht weiter verfolgt und könnte somit ein Bestandteil weiterer NK-Zell-Forschung sein. Für die

Funktionsanalyse der generierten Anti-hNKG2D Antikörper stellt CRTAM als Oberflächenprotein in jedem Fall einen wertvollen Biomarker dar, da sich dessen Expression auf der Zellmembran einfach mittels FACS-Analysen überprüfen lässt.

5.1.3 Die Aktivierung des NKG2D-Rezeptors durch seinen Liganden ULBP-1Fc führt zur Sekretion immunmodulatorischer Zytokine und Chemokine

Andre und Kollegen (2004) hatten bereits gezeigt, dass eine Aktivierung von NK-Zellen mit löslichen rekombinanten NKG2D-Liganden (MICA und ULBP-1) die Proliferation und Zytokin-Produktion von NK-Zellen induziert (Sutherland et al., 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg in der Transkription bestimmter löslicher Faktoren infolge einer NKG2D-Stimulation festgestellt werden. Dazu gehörten die Zytokine $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF und IL-3, das lösliche Protein LIF (Leukemia Inhibitory Factor) und die Chemokine IL-8 (CXCL8), CCL1 (I-309), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), XCL1 (Lymphotactin- α) und XCL2 (Lymphotactin- β).

Die Auswertungen der Microarray-Analyse hatten ergeben, dass die Transkription des Interleukins IL-3 nach Stimulation mit ULBP-1Fc mit einer mittleren Zunahme von 42 hierbei am stärksten induziert wurde. Eine verstärkte Expression von IL-3 konnte mittels Microarray und auch über semiquantitative RT-PCR auf RNA-Ebene beobachtet werden. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit auch nach verschiedenen methodischen Ansätzen (CBA und intrazelluläre FACS-Färbung, Daten nicht gezeigt) kein Nachweis für die Synthese von IL-3 als Protein erbracht werden. Dennoch scheint eine Produktion von IL-3 durch humane NK-Zellen nach deren Aktivierung kein abwegiges Ergebnis zu sein, da in einer anderen Studie von Wendt und Kollegen (2006) nach Stimulation von humanen NK-Zellen mit PMA/Ionomycin für 48 Stunden IL-3 in einem Protein-Array nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise könnte eine IL-3 Transkription auch aufgrund der unmittelbaren Nähe zum GM-CSF-Gen stattfinden, da diese beiden Gene auch regulatorische Elemente miteinander teilen (Nicola, 2001; Schrader, 2001). Allerdings lässt sich damit nur schwer erklären, warum IL-3 im Gegensatz zu GM-CSF nach einer ULBP-1Fc-Stimulation viel stärker transkribiert wird und GM-CSF, aber nicht IL-3, als Protein im Zellkulturüberstand detektiert werden kann.

Das proinflammatorische Zytokin GM-CSF bzw. CSF2 wurde im Microarray 21-fach stärker exprimiert. Ein Anstieg in der GM-CSF-Expression nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden (Cosman et al., 2001; Sutherland et al., 2001; Andre et al., 2004).

Die beiden Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ wurden in der vorliegenden Arbeit neun- bzw. achtfach differentiell exprimiert nachgewiesen. Auch deren Sezernierung war in

vorangegangenen Studien nach Stimulation des Rezeptors NKG2D gezeigt worden (Kubin et al., 2001; Jamieson et al., 2002; Billadeau et al., 2003; Zompi et al., 2003; Andre et al., 2004; Bryceson et al., 2006a).

Eine verstärkte Expression dieser Zytokine ist bei einer Immunantwort gegenüber Tumorzellen von enormer Wichtigkeit, da sie in verschiedene Prozesse der Immunmodulation wie Zellproliferation, Zellwachstum, Zellvitalität, Migration, Adhäsion, Chemokin- und Zytokininduktion eingreifen (Aggarwal et al., 2001; Billiau & Vandenbroeck, 2001; Nicola, 2001; Schrader, 2001). Allerdings kehrt sich dieser positive Effekt, den diese Zytokine bei einer Anti-Tumorimmunantwort ausüben, bei einer Autoimmunerkrankung zum Negativen. Hier werden die in den Entzündungsherden stattfindenden Prozesse durch die proinflammatorischen Zytokine zusätzlich verstärkt.

Anhand der Microarray-Analyse und der nachfolgenden Verifizierung auf Proteinebene konnten auch NKG2D-abhängige Chemokine identifiziert werden. Chemokine bilden eine Gruppe kleiner, strukturell verwandter Moleküle, die an der Regulation der Migration verschiedener Leukozyten beteiligt sind.

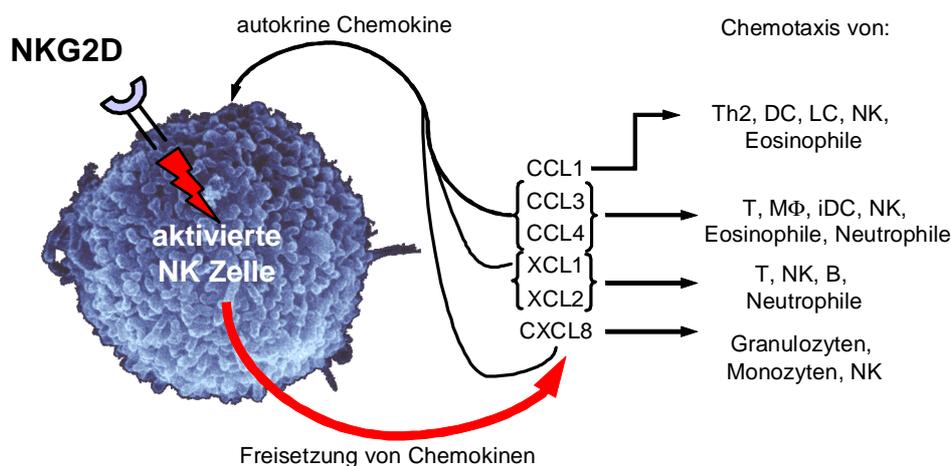


Abbildung 61: Modell: Sekretion von Chemokinen nach NKG2D-Stimulation und ihre Wirkung als Immunmodulatoren. MΦ: Makrophagen; iDC: immature DC; LC: Langerhans Zellen (Zlotnik & Yoshie, 2000; Homey et al., 2002; Robertson, 2002)

Sie lassen sich anhand der Anordnung von Cysteinresten in ihrer Aminosäuresequenz in vier Gruppen einteilen: CXC-, CC-, CX₃C- und C-Chemokine. Ihre biologische Aktivität erlangen sie über ihre Bindung an einen Chemokinrezeptor. Das sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die sich ebenfalls in vier Gruppen unterteilen lassen. Ein Chemokin kann an verschiedene Rezeptoren binden und ebenso können die verschiedenen Chemokinrezeptoren mit mehreren unterschiedlichen Chemokinen interagieren (Strieter et al., 1996; Zlotnik & Yoshie, 2000; Robertson, 2002).

Anhand der Microarray-Studie konnte für das Chemokin XCL-1 eine 12-fach stärkere, für das lösliche Protein LIF eine vierfach stärkere, für die beiden Chemokine CCL3 bzw. CCL4 eine dreifach stärkere und für die Chemokine CCL1, XCL-2 und IL-8 jeweils eine zweifach stärkere Transkription festgestellt werden.

Für die beiden Chemokine CCL3 und CCL4 konnte nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors auch eine verstärkte Proteinexpression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einigen anderen Studien, in denen aktivierte humane NK-Zellen untersucht wurden (Nieto et al., 1998; Robertson, 2002; Hanna et al., 2004b; Roda et al., 2006; Wendt et al., 2006). Nieto und Kollegen konnten in einer Studie von 1998 zeigen, dass eine Interaktion humaner NK-Zellen mit der NKG2D-Liganden tragenden Zelllinie K562 zur Produktion und Freisetzung der Chemokine CCL3 und CCL4 führt. Da die Zelllinie K562 die NKG2D-Liganden ULBP-1 und ULBP-2 auf der Oberfläche exprimiert, lassen sich die Daten sehr gut mit einer Stimulation durch rek. ULBP-1Fc vergleichen. Die beiden Chemokine CCL3 und CCL4 besitzen nicht nur chemotaktische Aktivität, sondern auch die Fähigkeit, die Freisetzung des Inhalts zytotoxischer Granula zu induzieren (Robertson, 2002). Sie stellen somit wichtige Regulatoren bei einer NK-Zell-vermittelten Immunantwort gegenüber infizierten und transformierten Zellen dar.

IL-8 konnte ebenfalls als sezerniertes Protein im Zellkulturüberstand detektiert werden, allerdings lag die freigesetzte Menge an IL-8 deutlich unter der von CCL-3 und CCL-4. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass auch andere Stimuli wie PMA/Ionomycin, IL-2 oder IL-12 bei humanen NK-Zellen die Produktion von IL-8 bewirken (Hanna et al., 2004b; Roda et al., 2006; Wendt et al., 2006).

Eine Sekretion von XCL-1-Protein nach ULBP-1Fc in den Zellkulturüberstand konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Studie, in der die humanen NK-Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden. Auch in dieser Studie konnte zwar eine Induktion der Genexpression von XCL1 im Microarray festgestellt werden. Jedoch konnte dessen Produktion und Freisetzung als Protein im Protein-Array nicht determiniert werden (Wendt et al., 2006).

Welche Funktion die von der NKG2D-aktivierten humanen NK-Zelle freigesetzten Chemokine während einer Immunantwort spielen könnten, ist in Abb. 61 schematisch dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass alle durch Aktivierung von NKG2D induzierten Chemokine in NK-Zellen einen autokrinen Charakter besitzen. Die Sekretion dieser Chemokine durch NK-Zellen bewirkt die Migration weiterer NK-Zellen zum Ort der Immunantwort (Robertson, 2002). Neben NK-Zellen werden zudem weitere Immunzellen, welche die entsprechenden Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, chemotaktisch angezogen. Die Rekrutierung weiterer Immunzellen ist für die Bekämpfung von Tumoren oder Infektionen ein essentieller Mechanismus, um die Immunantwort zu

verstärken (Homey et al., 2002). Im Falle einer Autoimmunerkrankung jedoch führt die Migration weiterer Immunzellen zu einer Zunahme der Entzündungsreaktion (Strieter et al., 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten ließen deutliche Unterschiede in der Expressionstärke von Zytokinen und Chemokinen bei den Spendern erkennen. Dies könnte auf eine mögliche Heterogenität der NK-Zellen in ihrem Aktivierungszustand zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur Heterogenität der Spender konnten jedoch in Vorversuchen keine qualitativen Unterschiede zwischen einer ULBP-1 und MICA-Stimulation festgestellt werden, so dass für die meisten Versuche nur einer der beiden löslichen Liganden eingesetzt wurde.

Für einige der Proteine, welche zwar auf RNA-, aber nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten, wurde zur Verifizierung der Microarray-Daten noch eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Hier schien die über die semiquantitative RT-PCR ermittelte Fold Change im Vergleich zu der im Microarray deutlich niedriger zu sein. Dies ist möglicherweise auf die Wahl des internen Kontrollgens β -Aktin zurückzuführen, welches nur noch bei einem PCR-Zyklus von 24 im exponentiellen ansteigenden Bereich lag und bereits nach 27 Zyklen abgesättigt war. Allerdings stellt sich die Auswahl eines passenden Housekeeping-Gens als generell schwierig dar, da für viele in der Literatur erwähnten Housekeeping-Gene sowohl Vor- als auch Nachteile bekannt sind. Die Ergebnisse waren dennoch eindeutig zu interpretieren, da anhand der β -Aktin-Kontrolle sowohl bei stimulierten als auch unstimulierten NK-Zellen gleiche Ausgangsmengen an cDNA sichergestellt werden konnte.

Die Daten der Microarray-Analyse und die Ergebnisse der anschließenden Verifizierung auf Proteinebene konnten zeigen, dass eine Ligandenerkennung mit Hilfe des NKG2D-Rezeptors in NK-Zellen sowohl zur Induktion positiver als auch negativer Signale der Zellregulation führt. Um die Funktion des NKG2D-Rezeptors für eine Tumor- oder Autoimmuntherapie nutzen zu können, müssen in weiteren Untersuchungen zunächst die einzelnen Faktoren und Bedingungen genauer analysiert werden, die für den Wechsel von NK-Zell-Aktivierung zu NK-Zell-Toleranz verantwortlich sind.

In jedem Fall konnten infolge der Microarray-Daten ein Membranprotein (CRTAM) und mehrere lösliche Proteine ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF, CCL3, CCL4) als geeignete Biomarker für eine weitere Funktionsanalyse der Anti-hNKG2D Antikörper identifiziert werden.

5.2 Phagen-Display-Selektion der VL und anschließende schrittweise Humanisierung der VH führen zur Generierung des schwach neutralisierenden Anti-hNKG2D scFv E1VLV71KVH

Aufgrund seiner ambivalenten Funktionalität stellt der NKG2D-Rezeptor im Humansystem ein viel versprechendes Zielantigen für eine Immuntherapie von Autoimmun- und Tumorerkrankungen dar.

Mit Hilfe der Hybridom-Technologie (Köhler und Milstein, 1975) konnte bereits eine Reihe von monoklonalen Antikörpern durch Immunisierung von Versuchstieren gewonnen werden, die gegen humanes oder murines NKG2D gerichtet sind und die für diagnostische oder experimentelle Zwecke verwendet werden (z.B. Maus Anti-hNKG2D ON72, Maus Anti-hNKG2D BAT221, Maus Anti-hNKG2D 1D11, Maus Anti-hNKG2D MAB139, Maus Anti-hNKG2D 5C6, Ziege Anti-hNKG2D EB06839, Ratte Anti-mNKG2D CX5, Ratte Anti-mNKG2D MAB1547, Ratte Anti-mNKG2D MI-6). Ein therapeutischer Einsatz von für den Patienten artfremden, monoklonalen Maus-Antikörpern im Rahmen einer Immuntherapie ist jedoch problematisch, da das menschliche Immunsystem wenige Tage nach deren systemischer Applikation humane Anti-Maus-Antikörper bilden würde, was die Neutralisation der verabreichten Maus-Antikörper aufgrund der HAMA-Reaktion zur Folge hat (DeNardo et al., 2003b) und zu klinischen Komplikationen führen kann. Alle bisher bekannten therapeutischen Ansätze mit Antikörpern setzen den Einsatz mehrerer Dosen mit vergleichsweise großen Mengen von oft mehreren hundert mg pro Gabe voraus, so dass die Immunogenizität einen limitierenden Faktor bei der Entwicklung von Antikörper-basierenden Medikamenten darstellt. Daher werden derzeit bei der heutigen Entwicklung therapeutischer Antikörper humane oder humanisierte mAks als Standard angesehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Guided Selection-Verfahrens zur Selektion einer humanen VL und einer anschließenden schrittweisen Humanisierung der ursprünglich murinen VH ein humanes Antikörperfragment isoliert werden, das den humanen NKG2D-Rezeptor spezifisch erkennt und dessen biologische Aktivität inhibiert.

5.2.1 Generierung zweier humaner VL-Ketten mittels Phagen-Display

Die Selektion einer humanen VL erfolgte ausgehend von den beiden murinen Anti-hNKG2D scFvs 6H7 und 6E5A7, bei denen im Vorfeld mittels Kompetitions- und ⁵¹Cr-Freisetzungsexperimenten hNKG2D-neutralisierende Bindungsspezifitäten nachgewiesen werden konnten.

Bei der hier beschriebenen Selektion wurde im Rahmen der Phagen-Display-Technologie das Verfahren einer Guided Selection eingesetzt (Jespers et al., 1994; Watkins & Ouwehand, 2000; Raum et al., 2001). Hierzu wurde zunächst unter Beibehaltung der parentalen murinen VH-Kette, welche maßgeblich an der Epitoperkennung des Antigens beteiligt ist und somit als Leitstruktur dient, die murine VL-Kette durch ein humanes VL-Repertoire ausgetauscht. Mittels Phagen-Display wurden anschließend Antigen-bindende VH/VL-Kombinationen selektiert. Die parentale VL-Kette wurde hierbei durch ein humanes VL-Repertoire mit gleichen Anteilen an V- κ und V- λ ersetzt. Die parentalen leichten Ketten gehörten zwar dem V- κ Typ an. Durch das Anbieten beider VL-Repertoires sollte jedoch die Wahrscheinlichkeit auf eine antigenspezifische Kombination mit der VH-Kette der Ursprungsantikörper mit einer humanen leichten Kette erhöht werden.

Mit Hilfe des Phagen-Display konnten zu der murinen 6H7-VH passende humane VL-Ketten gefunden werden. Die beiden aus dieser Selektion identifizierten leichten Ketten E1VL und G12VL wurden einem Datenbankvergleich unterzogen und konnten beide der V- λ 1 Familie zugeordnet werden. Dies lässt einen starken Selektionsprozess während des Phagen-Display-Vorgangs vermuten, da beide selektierten VL-Ketten von ähnlichen humanen Keimbahnsegmenten VL1_13-7(A)1c und VL1_14-7(A)1e abgeleitet sind und zudem untereinander eine sehr hohe Sequenzübereinstimmung aufweisen. Die Sequenzidentität zur parentalen VL-Kette beträgt dagegen nur ca. 50%. Bei einem Vergleich der Längen der CDRs 1-3 konnte in CDR1 und CDR3 ein deutlicher Unterschied zwischen der parentalen und den selektierten VL-Sequenzen festgestellt werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die ursprüngliche murine VL vom Typ κ und die selektierten humanen VL-Ketten vom Typ λ unterschiedliche kanonische Strukturen aufweisen. Somit konnte in diesem Fall die Theorie von Al-Lazikani und Kollegen (1997) nicht bestätigt werden, dass die kanonische Struktur der selektierten VL-Sequenzen der kanonischen Struktur der parentalen VL-Region entsprechen. Die starke Sequenzübereinstimmung zwischen E1VL und G12VL bestätigt jedoch die Annahme, dass in Guided Selection-Prozessen eine Präferenz für V-Gene mit gleicher kanonischer Struktur stattfindet, was von Jespers und Kollegen (1994) bereits beschrieben wurde. Dies belegt wiederum die Annahme, dass die dreidimensionale Struktur von VH- und VL-Ketten, ein wichtiger Faktor für ihre Kombinierbarkeit zu einem antigenbindenden Molekül bestimmter Spezifität darstellt.

5.2.2 Schrittweise Humanisierung der murinen 6H7 VH unter Beibehaltung der murinen CDRs

Aus der Literatur ist bekannt, dass die variable Region der schweren Kette im Gegensatz zur leichten Kette deutlich stärker an der Antigenbindung beteiligt ist (Kabat & Wu, 1991). Dies gilt vor allem für den hochvariablen CDR3-Bereich der VH-Kette, der ausschlaggebend für eine exakte Bindung an ein bestimmtes Epitop des Antigens ist. Aufgrund dieser Tatsache kann die alleinige Veränderung im CDR3-Bereich ausreichen, um die Antikörperspezifität zu verändern (Xu & Davis, 2000). Daher wurde in der hier beschriebenen Selektion die CDR3-Region der parentalen 6H7 VH-Kette in eine humane VH-Bibliothek integriert, um beim Phagen-Display in Kombination mit der humanen leichten Kette E1 bzw. G12 die Epitopspezifität beizubehalten. Mittels Phagen-Display konnte weder für die E1VL noch für die G12VL eine passende humane VH gefunden werden, so dass die parentale VH schrittweise in eine humane Aminosäuresequenz überführt werden musste. Dies bestätigt die allgemein bekannte Tatsache, dass eine Isolierung humaner Antikörperspezifitäten gegen humane Antigene aus Antikörper-Repertoires aus nicht immunisierten Spendern eine besondere Schwierigkeit darstellt. Somit beruht die Problematik naiver Antikörperbibliotheken eher auf einer geringen Frequenz autoreaktiver Spezifitäten als an der verwendeten Phagen-Display-Technologie (Aujame et al., 1997).

Die schrittweise Humanisierung stellt hierbei einen aufwendigen Prozess dar, der vor allem auf Versuch und Irrtum basiert. Aufgrund dessen wurde eine Humanisierung der VH nur für die Kombination mit der humanen E1VL durchgeführt, da diese im Vergleich zur G12VL eine bessere Bindungsaktivität an membrangebundenes NKG2D aufwies.

Durch Untersuchung der Proteinsequenz und mit Hilfe von Strukturanalysen des Konstruktes in Vector NTI ließen sich scheinbar strukturelevante Aminosäuren der VH identifizieren. Dazu zählten die Positionen 27, 29 und 30 im FR1 als auch Position 48 im FR2 und 67 in FR3, welche auch bereits in anderen Publikationen als kritische Aminosäuren beschrieben wurden (Tramontano et al., 1990; Foote & Winter, 1992; Almagro & Fransson, 2008). Mit Hilfe dieser Informationen konnten unterschiedlich stark humanisierte Konstrukte entwickelt werden. Die Aktivität der unterschiedlich stark humanisierten scFv wurde anschließend in Bindungsstudien untersucht. Die Daten dieser Bindungsstudien zeigten, dass die FR3-Region die Bindungsfähigkeit der scFv maßgeblich beeinflusste, da eine Humanisierung dieser Region zum sofortigen Verlust der Bindung des scFv führte. Eine ähnliche Beobachtung konnten Boado und Kollegen (2007) bei ihrer Humanisierung des murinen mAk HIRMAb machen, der an humanen Insulin-Rezeptor bindet. Hier führte der Einbau einer humanen FR3-Region zu einer Reduktion der Expression durch Myelomzellen. In der vorliegenden Arbeit musste daher

die Humanisierung des FR3 schrittweise vollzogen werden. Eine mit der Software Vector NTI ermittelte humane Sequenz mit nur zwei Aminosäuren murinen Ursprungs, die synthetisch hergestellt wurde, verlor jedoch vollständig ihre Bindungsaktivität. Die Rückführung einer einzigen Aminosäure von human (V) zu murin (K) an Position 71 stellte die Bindungsaktivität des scFv wieder her. Aus der Literatur ist bekannt, dass die FR-Struktur einen essentiellen Einfluß auf die Ausbildung der Antigenbindungsstelle und die kanonische Struktur ausübt. Tramontano und Kollegen (1990) hatten in früheren Studien gezeigt, dass die Aminosäure an der Position 71 im FR3 die Stellung und Konformation des CDR1 und des CDR2 in der VH-Domäne eines Immunglobulins beeinflusst. Durch die Interaktion mit den Aminosäuren an den Positionen 27 und 29 im FR1 nimmt die Position 71 eine wichtige Stellung bei der Fixierung der Struktur der VH und somit auch bei der Ausbildung einer ausreichenden Affinität zum Antigen ein. Die Bereiche, welche die Affinität eines Immunglobulins maßgeblich beeinflussen, ohne direkten Antigenkontakt zu haben, werden auch als Vernier-Zonen (VZ) bezeichnet. Zu diesen Bereichen zählen unter anderem die Positionen 27, 29 und 71 in der VH-Sequenz (Almagro & Fransson, 2008). Zudem haben die Untersuchungen verschiedener Immunglobuline gezeigt, dass sich an der Position 71 in der Mehrheit der Fälle ein Arg (R) oder Lys (K) befindet, jedoch seltener ein Val (V) oder Leu (L) (Tramontano et al., 1990; Foote & Winter, 1992). Dies trifft auch auf den in dieser Arbeit humanen E1VLV71KVH Antikörper zu. Er besitzt in den FR-Regionen der VH lediglich drei restliche Aminosäuren murinen Ursprungs, darunter F an Position 27, K an Position 71 und V an Position 78. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise die beiden Positionen 27 und 71 miteinander interagieren und somit durch eine Rückmutation an Position 71 die Bindung des Antikörpers an NKG2D wieder hergestellt werden konnte.

Der scFv E1VLV71KVH wurde aus Gründen der Stabilität in ein vollständiges Antikörpergerüst konvertiert und anschließend zur Ermittlung seiner biologischen Funktionalität in den beiden ⁵¹Cr-Freisetzungs-Experimenten getestet. Anhand dieser Experimente konnte eine deutlich verringerte Inhibierungseffizienz des humanen Antikörpers im Vergleich zum murinen Ausgangsantikörper 6H7 festgestellt werden. Diese qualitative Abweichung konnte hingegen bei einer Induktion der Zielzellyse nicht beobachtet werden. Die Problematik, dass nach vollendeter Humanisierung von Antikörpern eine deutlich Reduktion der Affinität auftritt, ist keine Seltenheit und ist in der Literatur bekannt (Wu et al., 1999a; Boado et al., 2007; Nakanishi et al., 2008).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, welche diese Beobachtung erklären könnten. So könnte z.B. eine Verschiebung des Bindungsepitops (Epitope Drift) zu einer schwächeren Neutralisierung führen. Dies erscheint aufgrund der Aufrechterhaltung der CDR-Bereiche der VH-Kette während der Humanisierungsschritte jedoch weniger

wahrscheinlich. Außerdem bleibt in den meisten Fällen bei einer Phagen-Display-Selektion mit einer Guided Selection der Bindungsbereich an das Antigen erhalten (Raum et al., 2001). Eine Epitopdrift kann aber dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da in der Literatur ebenfalls Berichte existieren, die eine deutliche Epitopverschiebung trotz des Einsatzes einer leichten oder schweren V-Kette als Leitstruktur beschreiben (Kang et al., 1991; Ohlin et al., 1996).

Es wäre zudem möglich, dass die vorgenommenen Sequenzveränderungen in den Gerüstregionen die thermodynamische Stabilität des E1VLV71KVH Antikörpers beeinflussten und somit die Fähigkeit zur Neutralisierung reduziert wurde.

Eine weitere Erklärung für die herabgesetzte Inhibierungseffizienz nach der Humanisierung könnte sein, dass während des Phagen-Display lösliches NKG2D zur Selektion antigenspezifischer scFv eingesetzt wurde. Im ⁵¹Cr-Freisetzungs-Experiment muss der Antikörper jedoch in der Lage sein, membranständiges NKG2D auf den Effektorzellen stabil zu binden, um die Bindung des Rezeptors an den Liganden blockieren zu können. Möglicherweise ist demnach eine Bindung des Antikörpers an lösliches NKG2D nicht gleichbedeutend mit der Bindung an Zell-gebundenes NKG2D. Dies ließen auch vergleichende Bindungsstudien im ELISA mit löslichem NKG2D und am FACS mit NKG2D-exprimierenden Zellen vermuten (Daten nicht gezeigt). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Selektion der scFv auf löslichem NKG2D dem E1VLV71KVH Antikörper die zur Neutralisierung erforderliche Bindungsfähigkeit an einen genau definierten Bereich der Interaktionsfläche des Rezeptors mit seinen Liganden fehlt.

Für eine immuntherapeutische Verwendung dieses Antikörpers bei Autoimmunerkrankungen ist jedoch gerade die Fähigkeit zur Inhibierung einer NKG2D-abhängigen Lyse von zentraler Bedeutung. Daher war es unerlässlich eine Affinitätsmaturierung anzuschließen. Diese sollte die Affinität gegenüber dem Antigen NKG2D und dadurch auch dessen antagonistische Effektivität deutlich erhöhen.

5.3 Generierung fünf hoch affiner humaner Anti-hNKG2D Antikörper mittels Affinitätsmaturierung der VL und VH des E1VLV71KVH

Es ist offenbar nicht selten, dass die Affinität von Antikörpern, die aus einem Repertoire einer Phagen-Display-Bibliothek stammen, für einen therapeutischen Einsatz nicht ausreicht (Hoogenboom & Chames, 2000). Dies traf auch auf den in der vorliegenden Arbeit humanen Anti-hNKG2D Antikörper E1VLV71KVH zu. Eine unzureichende Bindungsstärke ist auch von Antikörpern bekannt, die aus kombinatorischen Phagen-Display-Bibliotheken nicht immunisierter Spender generiert wurden. Diese werden im

Anschluss meist einer *in vitro* Affinitätsmaturierung unterzogen (Hoet et al., 2005). In der Regel ist das Potential eines Antikörpers sowohl von der Erkennung eines klinisch relevanten Epitops als auch von seiner Bindungsstärke abhängig. Somit war eine Affinitätsmaturierung des E1VLV71KVH für einen späteren immuntherapeutischen Einsatz in jedem Fall notwendig.

In vitro lässt sich eine Affinitätsmaturierung durch die Erstellung von Phagen-Bibliotheken mit variablen CDR-Bereichen unter zu Hilfenahme von speziellen Oligonukleotid-Primern und PCR erreichen. Die CDRs bieten sich hierbei besonders als Änderungsbereiche für eine Affinitätsmaturierung an, da sie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine bestimmte räumliche Struktur ausbilden, die eine Kontaktfläche zum Epitop des Antigens darstellt und somit maßgeblich an der Ausbildung der Spezifität eines Antikörpers beteiligt ist (Brekke & Sandlie, 2003).

Zur Herstellung dieser variablen CDR-Bereiche wurde sowohl eine Randomisierung des CDR3-Bereichs der VL als auch der VH, d.h. eine zufällige Substitution von Aminosäuren mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern und PCR in diesen hypervariablen Regionen durchgeführt (Aujame et al., 1997; Hayden et al., 1997; Hoogenboom, 1997). Diese CDR3-Bereiche wurden deshalb zur Bindungsoptimierung ausgewählt, da sie eine Schlüsselposition innerhalb der Antigenkontaktregion einnehmen.

Die aus den Bibliotheken stammenden scFv wurden anschließend im Phagen-Display mittels in solution-Panning einer schrittweise Selektion mit abnehmenden Antigenkonzentrationen unterzogen, da in früheren Publikationen mit dieser Methodik nahezu zehnfach höhere Affinitäten erzeugt werden konnten (Hoogenboom & Chames, 2000).

Bei einem ersten Durchgang der Affinitätsmaturierung der E1VL unter Beibehaltung der V71KVH konnten drei scFv gefunden werden, die im Vergleich zu dem ursprünglichen E1VLV71KVH eine dreifach höhere Affinität gegenüber membrangebundenem NKG2D aufwiesen. Deren VL-Ketten, B1, C7 und E4, wurden wiederum für die nachfolgende Affinitätsmaturierung der V71KVH als Leitstrukturen verwendet. Am Ende dieser Affinitätsmaturierung konnten schließlich fünf scFv identifiziert werden, die auf NKZellen eine um den Faktor 100 verbesserte Bindung gegenüber NKG2D zeigten. Somit war es trotz der Verwendung von löslichem NKG2D während des in solution-Pannings möglich, höher affine scFv zu selektieren, die auch auf membranständigem NKG2D deutlich besser binden konnten.

Basierend auf den aus der Affinitätsmaturierung isolierten scFv konnten in der vorliegenden Arbeit vollständige, humane IgG1-Antikörper hergestellt werden, die nicht nur NKG2D spezifisch, sondern auch mit ausreichender Affinität banden.

Diese könnten aufgrund ihrer Bindungseigenschaften potentielle Antikörper für eine zielgerichtete Therapie von NKG2D-vermittelter Autoimmunität darstellen.

5.4 Funktionsanalyse der humanen Anti-hNKG2D Antikörper E1VLV71KVH, B1VLB6VH und E4VLG10VH

5.4.1 Konvertierung der scFv in ganze humane Anti-hNKG2D Antikörper

Die geringe Größe der scFv hat zwar den Vorteil, dass eine schnellere Verteilung im Körper und ein besseres Eindringen der Moleküle im Gewebe begünstigt werden. Allerdings ergeben sich aus diesem Antikörper-Format auch Nachteile, die einen therapeutischen Einsatz limitieren. Die Halbwertszeit von scFv im Blut beträgt zumeist nur wenige Stunden (Larson et al., 1997; Fitch et al., 1999). Daher werden sie deutlich schneller aus dem Blutkreislauf gefiltert als ganze Antikörper, die oft mehr als vierzehn Tage im Organismus zirkulieren können. Die kleinen scFv-Moleküle werden hauptsächlich durch glomeruläre Filtration in den Nieren ausgeschieden. Die größeren Moleküle können hingegen die Poren der Nierenglomeruli, die wie ein Sieb wirken, nicht passieren, so dass sie im Blutstrom verbleiben. Die scFv-Moleküle sind jedoch kleiner als die Ausschlussgröße dieser Poren und werden somit relativ schnell aus dem Blut gefiltert (Kang et al., 2000). Man kann demnach davon ausgehen, dass die Effizienz eines neutralisierenden Anti-hNKG2D scFv-Moleküls durch eine rasche Eliminierung im Falle eines therapeutischen Einsatzes deutlich herabgesetzt würde.

Die scFv-Fragmente wurden daher zur Erhöhung ihrer Stabilität in ein vollständiges IgG-Molekül konvertiert. Dazu wurden die variablen Regionen der scFv-Fragmente auf DNA-Ebene mit konstanten Regionen eines humanen IgG1 λ -Antikörpers fusioniert und als vollständiger Antikörper exprimiert.

5.4.2 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine deutlich erhöhte Bindungsaffinität

Bei der Affinitätsmaturierung fand der Selektionsprozess mit einem rekombinanten Fc-konjugierten hNKG2D von R&D statt. Im Gegensatz zu dem ersten Phagen-Display-Durchgang, bei dem selbst hergestelltes PEGbio-hNKG2D verwendet wurde, führte die Selektion von VL und VH bei der Affinitätsmaturierung nach vier Phagen-Display-Runden zu einer starken Anreicherung Antigenbindender scFv-Fragmente. Anhand von Bindungsstudien mittels Titration auf NKL-Zellen und anschließender Sequenzanalyse konnten fünf verschiedene Klone identifiziert werden, die nach ihrer Konvertierung in volle Antikörper eine ähnlich ausgeprägte Bindungsaffinität gegenüber hNKG2D zeigten.

Die genaue Messung der Dissoziationskonstanten mittels SPR sollte hier eine bessere Einschätzung der Bindungsaffinitäten der verschiedenen Antikörper ermöglichen.

Die mittels SPR-Messung ermittelten Dissoziationskonstanten lagen für alle fünf Klone (C7VLC3VH, C7VLC12VH, B1VLB5VH, B1VLB6VH, E4VVG10VH) im Bereich von 10^{-11} M. Die beiden Kandidaten B1VLB6VH und E4VVG10VH zeigten hierbei mit $2,25 \times 10^{-11}$ M und $2,70 \times 10^{-11}$ M die besten Affinitäten und wurden somit für eine weitere Charakterisierung als potentielle therapeutische Antikörper ausgewählt. Die niedrigste Dissoziationskonstante ($1,65 \pm 0,50 \times 10^{-9}$ M) wurde für die initiale humane Variante E1VLV71KVH ermittelt, der nachfolgend auch als Referenzantikörper bei weiteren Funktionsanalysen der affinitätsmaturierten Moleküle mitgeführt wurde. Die Ergebnisse der SPR-Messung waren vergleichbar mit Daten aus FACS-Analysen, in denen die Antikörper auf NKG2D-exprimierenden Zellen (NKL) titriert wurden. Somit konnte für die verschiedenen aus der Affinitätsmaturierung stammenden Klone sowohl auf löslichem rekombinanten als auch auf membranständigem NKG2D eine hohe Bindungsaffinität sichergestellt werden.

5.4.3 Die humanen Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine hohe Temperatur- und Serumstabilität

Die Stabilität bei Körpertemperatur und die Resistenz gegenüber Serumproteasen sind für den klinischen Einsatz eines Antikörpers wichtige Faktoren, die im Vorfeld untersucht und gewährleistet sein müssen. Die Stabilität der Antikörper B1VLB6VH, E4VVG10VH und E1VLV71KVH wurde durch die Bestimmung der verbliebenen Bindungsaktivität nach Inkubation in humanem Serum bei 37°C getestet. Es zeigte sich eine außerordentlich hohe Resistenz aller drei Molekülformate gegenüber der Inkubation in humanem Serum bei 37°C, eine notwendige Voraussetzung für den späteren Einsatz im Menschen. Auch im Thermostabilitätsvergleich zeigten die drei verschiedenen IgG-Antikörper keine deutlichen Unterschiede. Alle vier Antikörper konnten einer Hitzeeinwirkung von bis zu 70°C problemlos standhalten. Alle drei affinitätsmaturierten Antikörper verloren hierbei erst an Temperaturen von über 80°C signifikant an Aktivität. Dies ist ein Zeichen von hoher intrinsischer Stabilität. Beispielsweise wiesen drei zur Therapie zugelassene Antikörper (Trastuzumab, Cetuximab und Edrecolomab) unter vergleichbaren Testbedingungen Temperaturstabilitäten zwischen 71°C und 76°C auf (Tobias Raum, persönliche Mitteilung).

5.4.4 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper weisen verstärkte Kreuzreaktivitäten auf

In der Pharmabranche ist es aufgrund gesetzlicher Auflagen üblich, mit tierexperimentellen Versuchsansätzen Risiken von neuen Chemikalien und Medikamenten für Menschen abzuschätzen. Auch in der vorliegenden Arbeit sollten die Bindungseigenschaften der humanen Anti-hNKG2D Antikörper auf unterschiedlichen NKG2D-Spezies mittels FACS untersucht werden, um einen späteren Einsatz dieser Moleküle in einem geeigneten Tiermodell für autoimmune Erkrankungen begründen zu können. Hierzu mussten zur Analyse einer möglichen Kreuzreaktivität der Antikörper CHO-NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Transfektanten der unterschiedlichen Spezies *M. mulatta*, *M. fascicularis*, *C. jacchus* und *M. musculus* hergestellt werden. Die Spezies *H. sapiens* war bereits als CHO NKG2D⁺⁺/DAP10⁺⁺-Transfektante aus Vorarbeiten vorhanden.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien am FACS hatten ergeben, dass bei den beiden affinitätsmaturierten humanen Antikörpern neben der Interaktion mit hNKG2D und NKG2D von *M. mulatta* und *M. fascicularis* noch weitere Kreuzreaktivitäten beobachtet werden können. So war der Antikörper B1VLB6VH auch in der Lage, an das Marmoset (*C. jacchus*) NKG2D zu binden. Bei dem E4VLG10VH-Antikörper konnte sogar bei allen fünf Spezies eine Bindung nachgewiesen werden, wobei die Bindungsstärke bei den Spezies *C. jacchus* und *M. musculus* deutlich niedriger war. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den Daten aus den vergleichenden Sequenzanalysen des NKG2D-Rezeptors der unterschiedlichen Spezies vereinbaren. Es war demnach zu erwarten, dass alle bei der Studie verwendeten gegen hNKG2D gerichteten Antikörper auch an das NKG2D von *M. mulatta* und *M. fascicularis* banden, da hier eine Identität zwischen der Aminosäuresequenz von Makaken- und human NKG2D bis zu 94,4% festgestellt werden konnte. Im Vergleich dazu war eine Bindung der Antikörper an den NKG2D-Rezeptor der Spezies *C. jacchus* und *M. musculus* weniger zu erwarten. Hier lag die Sequenzidentität zwischen *H. sapiens* und *C. jacchus* bei 83,6% und zwischen *M. musculus* und *H. sapiens* bei nur 54,9%.

Möglicherweise lässt sich die nachgewiesene Kreuzreaktivität der beiden Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH mit dem NKG2D-Rezeptor der Spezies *C. jacchus* und *M. musculus* auf eine Epitopdrift zurückführen, der während der Affinitätsmaturierung stattgefunden haben könnte. Ein Nachweis über Westernblot und über ein sogenanntes Epitop-Mapping war jedoch leider nicht möglich, da keiner der Antikörper in der Lage war, denaturiertes NKG2D und damit lineare Epitope zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Annahme, dass eine Epitopdrift stattgefunden haben könnte, lag die Vermutung nahe, dass infolge der Affinitätsmaturierung nicht nur die Affinität sondern auch die biologische Aktivität der Antikörper verändert worden war.

5.4.5 Affinitätsmaturierte humane Anti-hNKG2D Antikörper zeigen eine verbesserte biologische Aktivität in den ⁵¹Cr-Freisetzungsexperimenten

Neben einer ausreichenden Affinität war die Effizienz zur Neutralisierung der Aktivität des NKG2D-Rezeptors ein ausschlaggebende Auswahlkriterium für geeignete Anti-hNKG2D Antikörper. Mit Hilfe des durchflußzytometrischen Competitionstests kann zwar die Inhibition einer hULBP-2Fc-Bindung auf der Zelloberfläche NKG2D-exprimierender Zellen nachgewiesen werden. Anhand dieses Tests können jedoch keinerlei Aussagen über die biologische Aktivität der Antikörper getroffen werden. Daher wurde für die Charakterisierung der humanen Anti-hNKG2D Antikörper ein Zell-basierter Test für den Nachweis einer Inhibition von NKG2D eingesetzt.

Als Maß für die Inhibierungseffizienz der Antikörper wurde die NKG2D-vermittelte Zellyse Liganden-exprimierender Zellen im ⁵¹Cr-Freisetzung-Assay gemessen. Ein ⁵¹Cr-Freisetzung-Assay ist dem durchflußzytometrischen Test aus folgenden Gründen vorzuziehen. Die Bindung von PEGbio-ULBP-2Fc an NKL-Zellen erschien bei der Detektion über Streptavidin-PE am Durchflußzytometer nur als unregelmäßiges Signal. Dies könnte möglicherweise auf eine ungleichmäßige PEG-Biotinylierung des ULBP-2Fc zurückgeführt werden. Diese unregelmäßige Signalstärke erschwert jedoch die Erfassung von feinen Abstufungen in der Wirksamkeit, mit der die ULBP-2Fc-Bindung durch die humanen Anti-hNKG2D Antikörper inhibiert wird, und damit die Quantifizierung der Neutralisierung.

Zudem ist es für eine therapeutische Anwendung essentiell, dass die Moleküle bei physiologischen Temperaturen stabil und funktionell sind. Dieser Aspekt wird bei einem durchflußzytometrischem Versuchsansatz jedoch nicht berücksichtigt, da hier während des Färbungsvorganges alle Inkubationen bei 4°C stattfanden. Somit ist der entscheidende Vorteil eines ⁵¹Cr-Freisetzungsexperimentes, dass die Stabilität der scFv-Fragmente bei physiologischen Temperaturen mit in das Testergebnis einfließt. Für die Inhibition der Zielzellyse ist nicht nur die Affinität ausschlaggebend, mit dem der neutralisierende Antikörper an das mit dem Liganden interagierende Epitop des NKG2D-Rezeptors bindet. Vielmehr muss die Interaktion von NKG2D-Liganden mit ihrem Rezeptor über einen bestimmten Zeitraum bei einer Temperatur von 37°C verhindert werden. Ein zelluläres *in vitro*-System simuliert daher deutlich genauer als der durchflußzytometrische Test die *in vivo*-Situation, in der sich ein therapeutisches Antikörper-Molekül bewähren muss.

Mit Hilfe des *in vitro* Inhibierungsassays (⁵¹Cr-Freisetzung-Assay) konnte für die Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH nach der Affinitätsmaturierung gegenüber ihrem ursprünglichen Ausgangskonstrukt E1VLV71KVH ein deutlich verbessertes Inhibierungssignal festgestellt werden. Die bei diesen Versuchen generierten IC50-Werte

der beiden affinitätsmaturierten Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH waren mit $3,40 \pm 1,78$ und $3,30 \pm 1,20 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$ um den Faktor 100 niedriger als die der initial humanen Variante E1VLV71KVH.

Für einen therapeutischen Einsatz bei Autoimmunerkrankungen im menschlichen Organismus sollte die Hauptaufgabe eines Anti-hNKG2D Antikörpers die Inhibierung der Lyse körpereigener Liganden-tragender Zellen sein. Agonistische Eigenschaften wie Induktion von Zellyse und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine könnten bei einer Behandlung von Autoimmunität schwerwiegende Folgen für den Patienten haben. Daher wurde auch die Aktivierungseffizienz der Anti-hNKG2D Antikörper im Redirected Lysis-Experiment untersucht. NKL-Zellen wurden hierbei mit unterschiedlichen Anti-hNKG2D Antikörper inkubiert und anschließend zusammen mit der ^{51}Cr -beladenen Zielzelllinie P815 kultiviert. In diesem Versuchsansatz konnte ebenfalls ein deutlich höheres Aktivierungspotential der affinitätsmaturierten Antikörper beobachtet werden. Der EC50-Wert der beiden Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH lag bei $3,18 \pm 2,04 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ bzw. $2,91 \pm 1,77 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ und war somit deutlich niedriger als bei der ersten humanen Version E1VLV71KVH mit $1,99 \pm 1,58 \times 10^{-1}$.

Somit konnte mit Hilfe dieser beiden *in vitro*-Systeme gezeigt werden, dass die Affinitätsmaturierung nicht nur eine verbesserte Affinität, sondern auch ein verstärktes Inhibierungs- und Aktivierungspotential der Antikörper zur Folge hatte. Eine solche ambivalente Funktionalität, d.h. potentielle agonistische Aktivität bei einer Zell-vermittelten Lyse und die Fähigkeit zur Inhibierung der Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden, ist auch vom murinen Anti-hNKG2D Antikörper MAB139 von R&D aus anderen Studien bekannt.

Ein Ziel weiterer Forschung sollte in jedem Falle eine bessere Übertragbarkeit der Daten auf den menschlichen Organismus sein. Dazu könnten ^{51}Cr -Freisetzungsexperimente mit NK-Zellen aus humanen PBMCs und relevanten humanen Zielzellen aus Patientenmaterial (z.B. aus Tumor- oder RA-Gewebe) entwickelt und optimiert werden. Weiterhin wäre es für einen immuntherapeutischen Einsatz der Anti-hNKG2D-Antikörper von großem Interesse, eine ADCC zwischen NK-Zellen zu untersuchen. Da ein Großteil der NK-Zellen Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, wäre es durchaus möglich, dass ein Anti-hNKG2D Antikörper ähnlich wie beim Redirected Lysis-Experiment aufgrund einer Kreuzvernetzung zwischen dem NKG2D der einen und dem Fc-Rezeptor der anderen NK-Zelle eine unerwünschte Zellyse einleitet. Somit ist auch die Frage noch nicht geklärt, ob die beim ^{51}Cr -Freisetzung-Assay beobachtete Reduktion der Zielzellyse auf eine durch Kreuzvernetzung der Antikörper induzierte gegenseitige Eliminierung der NK-Zellen zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit zum „Brudermord“ aufgrund eines

Einsatzes von Anti-hNKG2D Antikörpern wurde jedoch bisher in keiner der veröffentlichten Artikel mit NKG2D-Thematik diskutiert.

5.4.6 Die ambivalente Funktionalität der humanen Anti-hNKG2D Antikörper kann mit Hilfe von Biomarkern bestätigt werden

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe des Microarray und der anschließenden Verifizierung auf Proteinebene Biomarker etabliert werden, die für eine NKG2D-vermittelte Immunantwort charakteristisch sind. Diese konnten als hilfreiche Werkzeuge für die weitere Charakterisierung der Effizienz neutralisierender bzw. induzierender Anti-hNKG2D Antikörper verwendet werden.

Bei einer Behandlung von NKG2D-vermittelter Autoimmunität ist demnach vor allem das Potential eines Antikörpers zur Inhibierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion von zentraler Bedeutung. Daher wurde auch untersucht, ob die Antikörper in der Lage sind, eine durch Interaktion zwischen Ligand und NKG2D-Rezeptor eingeleitete Aktivierung und Zytokinfreisetzung humaner NK-Zellen zu inhibieren. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die neutralisierende Eigenschaft der humanen Anti-hNKG2D Antikörper auf humanen NK-Zellen anhand einer reduzierten Produktion der löslichen Faktoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF und der Expression des Oberflächenmoleküls CRTAM gemessen. Durch den Einsatz von Anti-hNKG2D Antikörpern konnte sowohl für eine Stimulation mit dem Liganden MICA als auch mit dem Liganden ULBP-1 eine Inhibierung der CRTAM-Expression bewirkt werden. Eine reduzierte CRTAM-Expression könnte möglicherweise eine Antikörper basierte Therapie von Autoimmunerkrankungen zusätzlich unterstützen, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass CRTAM aufgrund seiner Interaktion mit Necl-2 die zytotoxische Synapse von NK-Zellen zu stabilisieren scheint (Boles et al., 2005; Fuchs & Colonna, 2006). Allerdings könnte ebenfalls aus diesem Grund eine herabgesetzte CRTAM-Expression die Entstehung von Tumoren begünstigen.

Weiterhin konnte in der hier beschriebenen Studie eine NKG2D-vermittelte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und GM-CSF durch Inkubation der NK-Zellen mit den unterschiedlichen Anti-hNKG2D Antikörpern signifikant reduziert werden.

Eine Blockade der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen könnte sich bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen unterschiedlich auswirken. Bei Autoimmunerkrankungen könnte demnach durch den Einsatz eines Anti-hNKG2D Antikörpers und die dadurch bewirkte herabgesetzte Zytokin- und Chemokin-Produktion der an den Entzündungsherden stattfindende proinflammatorische Prozess gestoppt werden. Jedoch geschieht dies immer auf Kosten einer funktionierenden

Tumorerkrankung, d.h. eine reduzierte Zytokin- und Chemokin-Produktion könnte auch immer eine Tumorentstehung und –progression zur Folge haben. Erst kürzlich konnte in einer Studie von Guerra und Kollegen (2008) mit NKG2D-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass eine fehlende NKG2D-Aktivität die Entstehung von spontanen Tumoren begünstigt.

Für alle drei humanen Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH, E4VLG10VH und E1VLV71KVH konnte gezeigt werden, dass eine mittels Platten-Immobilisierung herbeigeführte Kreuzvernetzung zu einer NKG2D-abhängigen Stimulation der humanen NK-Zellen führte. Diese hatte die Freisetzung der NKG2D-spezifischen proinflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ und GM-CSF in das Zellkulturmedium zur Folge. Hinsichtlich einer Induktion der Freisetzung von Zytokinen mittels Anti-NKG2D Antikörpern existieren in der Literatur unterschiedliche Daten. Während in der Maus durch den Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers bei NK-Zellen eine IFN γ Sekretion induziert werden konnte (Jamieson et al., 2002), war dies hingegen bei humanen NK-Zellen unter Verwendung muriner Anti-hNKG2D Antikörper nicht möglich (Billadeau et al., 2003; Castriconi et al., 2003; Andre et al., 2004). Für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und Angaben aus der Literatur gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die hier charakterisierten humanen Anti-hNKG2D Antikörper andere Epitope erkennen als die in den Publikationen verwendeten murinen Anti-hNKG2D Antikörper (MAB139 und BAT221). Für MAB139 konnte in der hier beschriebenen Studie ebenfalls keine Induktion der Freisetzung von Zytokinen bei humanen NK-Zellen bewirkt werden (Daten nicht gezeigt). Bei Zell-vermittelten Lyse-Studien hingegen ist eine agonistische Aktivität dieses Antikörpers deutlich zu erkennen. Es wäre demnach durchaus möglich, dass erst in Folge einer Humanisierung von Anti-hNKG2D Antikörpern eine Stimulation bei humanen NK-Zellen eingeleitet werden kann, die letztendlich auch zu einer Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen führt. Somit könnte der von Jamieson und Kollegen aus der Ratte stammende monoklonale Anti-mNKG2D Antikörper MI-6 (2002) aufgrund seiner Herkunft einen aktivierenden Effekt auf murine NK-Zellen ausüben. Eine Induktion von proinflammatorischen Zytokinen infolge einer Anwendung von Anti-hNKG2D Antikörpern würde jedoch im Falle einer Autoimmunerkrankung sehr wahrscheinlich zu einem Voranschreiten der Erkrankung führen.

5.4.7 Humane Anti-hNKG2D Antikörper werden nach Interaktion mit ihrem Zielantigen NKG2D von humanen NK-Zellen internalisiert

Viele Publikationen hatten gezeigt, dass eine chronische Exposition des NKG2D-Rezeptors mit seinen Liganden zu dessen Internalisierung und anschließender

lysosomaler Degradation führt. Infolge dieser Internalisierung konnte eine reduzierte Oberflächenexpression des NKG2D-Rezeptors und eine damit zusammenhängende herabgesetzte NKG2D-vermittelte Zytotoxizität festgestellt werden (Groh et al., 2002; Coudert et al., 2005; Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005; Song et al., 2006). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass der Rezeptor möglicherweise auch nach der Bindung von Anti-NKG2D Antikörpern internalisiert werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine kinetische Studie zur Untersuchung einer Internalisierung der humanen Anti-hNKG2D Antikörper durch die humane NK-Zelllinie NKL durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kinetik zeigten, dass nach einer schnellen Polarisierungsphase des Antikörpers bereits nach 15 min eine vesikelförmige Internalisierung der Anti-hNKG2D Antikörper in das Zytoplasma der NKL-Zelle stattfindet. Anhand der hier durchgeführten Färbung konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob die Antikörper im Anschluss an ihre Internalisierung auch im lysosomalen System degradiert werden. Hierzu wären weitere Nachforschungen notwendig. Diese könnten z.B. mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Lyso-Trackern erfolgen, welche den Nachweis einer Lokalisation der Antikörper in Lysosomen ermöglichen könnten.

Eine Internalisierung von Antikörpern durch die Zielzelle nach Interaktion mit ihrem Antigen ist kein ungewöhnlicher Prozess und wurde in der Literatur bereits für einige bestimmte Integrin-spezifische Antikörper beschrieben, so z.B. für den Antikörper Efalizumab (Raptiva®), der gegen das Antigen CD11a gerichtet ist (Coffey et al., 2004). Auch für einen Anti-CD95 Antikörper konnte eine Internalisierung nachgewiesen werden (Algeciras-Schimnich et al., 2002).

Eine schnelle durch Internalisierung herbeigeführte Eliminierung der Anti-hNKG2D Antikörper würde sich bei einem immuntherapeutischen Ansatz in erster Linie auf das pharmakokinetische und pharmakodynamische Profil der Antikörper auswirken. In weiteren Studien müsste daher vor allem untersucht werden, ob aufgrund der Internalisierung auch die Verteilung und die Dichte des NKG2D-Rezeptors an der Zelloberfläche beeinflusst wird. Könnte man durch den Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers nicht nur die Interaktion mit den verschiedenen Liganden blocken, sondern zusätzlich die Präsenz des NKG2D-Rezeptors an der Oberfläche von zytotoxisch aktiven Zellen reduzieren, so wäre es möglich, dadurch einen therapeutischen Effekt bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu verstärken.

In diesem Zusammenhang müsste allerdings auch überprüft werden, ob ein Recycling des Rezeptors und ein Rücktransport an die Zelloberfläche möglich ist.

5.4.8 Klinische Relevanz der humanen Anti-hNKG2D Antikörper

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die humanen Anti-hNKG2D Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH spezifisch an den humanen aktivierenden Rezeptor NKG2D binden. Sie sind einerseits in der Lage, eine NKG2D-abhängige Zielzellyse und Zytokinfreisetzung zu inhibieren, andererseits bewirken sie im kreuzvernetzten Zustand eine Stimulation des NKG2D-Rezeptors. Diese kann nicht nur eine Fc-Rezeptor-vermittelte Zellyse sondern auch eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge haben. Alle hier beschriebenen Funktionen der humanen Anti-hNKG2D Antikörper wurden in einem Modell schematisch dargestellt (Abb. 62).

Die hier beschriebenen biophysikalischen Eigenschaften der Anti-hNKG2D Antikörper, vor allem die Resistenz gegenüber dem Einfluss hoher Temperaturen und deren hohe Stabilität gegenüber Serumproteasen, lassen erwarten, dass diese Proteine auch *in vivo* wenig anfällig gegenüber Degradation sind und sie somit auch während der Zirkulation im Organismus aktiv bleiben. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die Pharmakokinetik dieser Antikörper aufgrund ihrer Internalisierung durch NK-Zellen stark beeinflusst werden könnte.

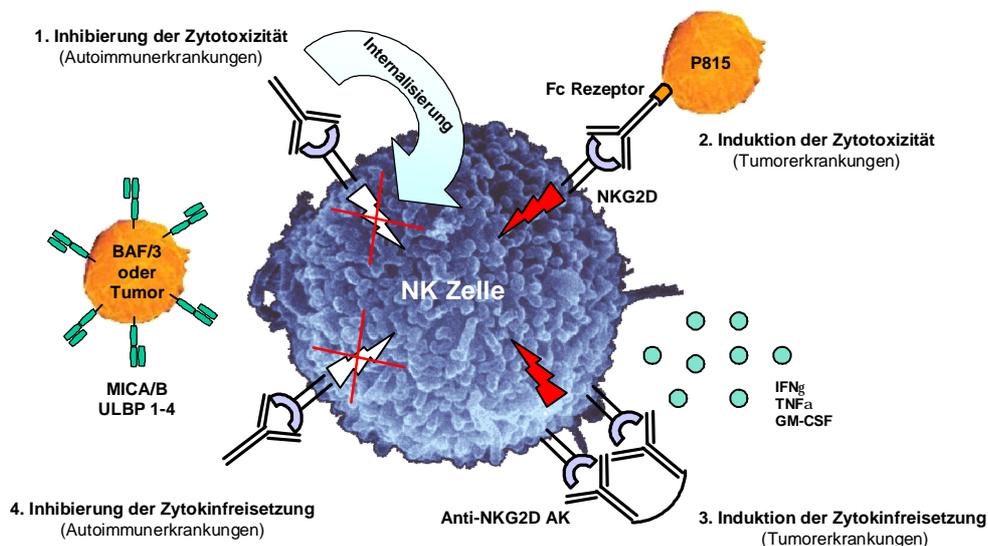


Abbildung 62: Modell: mögliche Eigenschaften eines anti-hNKG2D Antikörpers. 1./4. Der Einsatz eines anti-hNKG2D Antikörpers blockiert die Bindung von Liganden an den Rezeptor und bewirkt somit sowohl die Inhibierung der Zytotoxizität gegenüber Liganden positiver Zellen, als auch die Inhibierung einer Zytokinfreisetzung. Durch eine Internalisierung des Antikörpers zusammen mit dem Rezeptor wird die Oberflächenexpression des NKG2D herabgesetzt. **2./3.** Im Falle einer Kreuzvernetzung des Antikörpers vor oder nach der Bindung an den Rezeptor eine Zytotoxizität oder Freisetzung von Zytokinen induziert werden.

Neben ihrer hohen Stabilität kann zudem aufgrund ihrer Humanisierung von einer geringen Immunogenität der beiden Antikörpermoleküle im menschlichen Organismus

ausgegangen werden. Dies konnte auch schon für andere humane Antikörper festgestellt werden (Pavlinkova et al., 2001).

Für die Untersuchung der Pharmakokinetik und einer therapeutischen Wirksamkeit dieser Antikörper während einer präklinischen Phase bei Autoimmunerkrankungen *in vivo* stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Diese sollen im folgenden Abschnitt hinsichtlich ihrer tatsächlichen Aussagekraft für den therapeutischen Nutzen eines Anti-NKG2D Antikörpers im Menschen kritisch betrachtet werden.

Da für den Antikörper E4VLG10VH eine Kreuzreaktivität mit murinem NKG2D nachgewiesen werden konnte, würde in einer präklinischen Studie seine Wirksamkeit sehr wahrscheinlich im NOD-Maus-Modell getestet werden. Auch Ogasawara und Kollegen (2004) konnten in einem NOD-Modellsystem durch den Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers (CX5) schon Erfolge bei der Therapie von T1DM erzielen. In NOD-SCID Mäusen, welche aufgrund fehlender T-, B- und NK-Zellfunktionen keine autoimmune Diabetes entwickeln können, konnte durch Injektion autoreaktiver T-Zellen aus diabetischen NOD-Mäusen und anschließender Behandlung mit Anti-mNKG2D Antikörper CD8⁺ T-Zellen als Zielzellen des Antikörpers identifiziert werden. Die NOD-Maus ist generell ein beliebtes Modellsystem zur Untersuchung von humaner T1DM. T1DM, auch autoimmune Diabetes genannt, ist eine multifaktorielle Erkrankung, die bei prädisponierten Individuen auftritt und von vielen verschiedenen Faktoren wie genetischer Prädisposition, Ernährungs- und Umweltrisikofaktoren, ebenso wie fehlregulierten Immunantworten beeinflusst wird. Hierbei spielen autoreaktive T-Zellen, die während der Pathogenese auftreten, eine wichtige Rolle bei der Zerstörung pankreatischer Insulinproduzierender β -Zellen (Bresson & von Herrath, 2007).

Auch die Entwicklung von autoimmunem Diabetes in NOD-Mäusen beruht auf der Autoreaktivität von T-Zellen, weshalb sie als Tiermodell von Wissenschaftlern favorisiert werden (Yang & Santamaria, 2006). Ogasawara und Kollegen (2004) konnten in diesem Modell-System zeigen, dass eine verstärkte Expression des murinen NKG2D-Liganden RAE-1 im Pankreas von prädiabetischen Mäusen stattfindet, welche eine NKG2D-vermittelte Zytotoxizität durch autoreaktive T-Zellen einleitet und somit eine autoimmune Diabetes hervorruft. Im Humansystem ist jedoch ein Zusammenhang zwischen der Expression humaner NKG2D-Liganden wie MICA und MICB und der Entstehung von T1DM noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Publikationen lassen bei T1DM-Patienten einen MICA-Polymorphismus als mögliche Ursache für eine genetische Suszeptibilität vermuten (Gambelunghe et al., 2000; Alizadeh et al., 2007; Gambelunghe et al., 2007). Bisher ist für T1DM allerdings nicht bekannt, ob eine erhöhte Expression von humanen NKG2D-Liganden auf den pankreatischen β -Zellen vorliegt. Bei der Wahl der NOD-Maus als Tiermodell für die präklinische Untersuchung von Anti-NKG2D Antikörpern

ist weiterhin zu registrieren, dass es zwischen dem NKG2D-Rezeptor des Menschen und der Maus abgesehen von einer vergleichsweise geringen Sequenzidentität von 54,9% weitere Unterschiede gibt. Diese sollten hinsichtlich einer Übertragbarkeit von Daten aus jeglichen Maus-Modellen auf den Menschen berücksichtigt werden. So konnte z.B. auf humanen myeloiden Zellen im Gegensatz zur Maus keine Oberflächenexpression von NKG2D festgestellt werden (Diefenbach et al., 2000). Obwohl in humanen Lymphozyten ebenfalls eine alternative, verkürzte Splicevariante des NKG2D-Transkripts gefunden werden konnte, ließen sich funktionell keine Ähnlichkeiten mit dem murinen NKG2D-S feststellen. Außerdem konnte im Falle des humanen NKG2D-Rezeptors keine Assoziation mit DAP12 nachgewiesen werden (Rosen et al., 2004). Hinzu kommt, dass in der Maus andere Liganden für NKG2D existieren als es im Menschen der Fall ist (Raulet, 2003). Aufgrund der evolutionären Abspaltung der beiden Spezies vor ca. 65 Millionen Jahren ist es nicht weiter überraschend, dass sich die Immunsysteme zwischen Mensch und Maus in vielen Faktoren stark unterscheiden (Haley, 2003; Mestas & Hughes, 2004).

Bei dem NOD-Modell ist zusätzlich zu erwähnen, dass bereits 125 verschiedene Therapien existieren, welche die Entwicklung einer T1DM in NOD-Mäusen mildern oder sogar verhindern können, aber nur wenige dieser Therapieformen fanden je eine Anwendung im menschlichen Organismus (Roep & Aktinson, 2004). Bisher existieren lediglich drei klinische Phase II/III Studien, die sowohl Sicherheit als auch Effektivität in erwachsenen Patienten mit latenter autoimmuner Diabetes aufzeigen. Diese sind ein Anti-CD3 Antikörper, DiaPep277 und GAD65. Ein Großteil der Patienten reagiert bedauerlicherweise nicht positiv auf diese Therapieformen und benötigt nach Beendigung der Therapie weiterhin Insulin (Bresson & von Herrath, 2007). Diese Tatsache kann möglicherweise auf die vorhandenen Unterschiede zwischen dem Modellsystem und einer humanen T1DM zurückgeführt werden (Roep, 2003).

Die autoimmune RA könnte ein weiterer möglicher Einsatzbereich für Anti-NKG2D Antikörper zur Therapie von Autoimmunität darstellen. Hier konnte im Humansystem ein Zusammenhang im Fortschreiten der Erkrankung und der Expression von NKG2D-Rezeptor und seinen Liganden nachgewiesen werden (Caillat-Zucman, 2006). Es wird vermutet, dass die Pathogenese der RA auf eine Aktivierung autoreaktiver CD4⁺ CD28⁻ T-Zellen zurückzuführen ist, die das synoviale Gewebe infiltrieren (Schmidt et al., 1996a; Schmidt et al., 1996b; Martens et al., 1997). Um eine Wirksamkeit der Anti-NKG2D Antikörper *in vivo* nachweisen zu können, müssten jedoch zunächst präklinische Studien im Tier durchgeführt werden. RA ist allerdings keine Krankheit, die natürlicherweise in Ratten und Mäusen vorkommt. Sie kann erst durch eine künstliche Immunisierung der Tiere induziert werden, die in der Praxis auf vielfältige Weise durchgeführt wird (Holmdahl, 2000). Eine Variante ist hierbei eine mehrfache Injektion von murinem oder

bovinem Kollagen in die Maus. Man bezeichnet diese Form der Arthritis auch als sogenannte Kollagen-induzierte Arthritis (CIA). Das bedeutet, dass es in diesem Modell lediglich eine Ursache für die Entwicklung einer Autoimmunreaktion gibt. Bei einer RA im menschlichen Organismus handelt es sich jedoch um eine weitaus komplexere Erkrankung mit vielen Ursachen und unterschiedlich stark ausgeprägten Symptomen (Goronzy et al., 2005; Goronzy & Weyand, 2005).

Eine weitere Autoimmunerkrankung, bei der vermutet wird, dass NKG2D bei der Pathogenese eine Rolle spielt, ist Multiple Sklerose (MS). MS ist eine schwerwiegende Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der in den Entzündungsherden (Plaques) T-, B-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden konnten, was als Hinweis für eine Autoimmunreaktion gewertet wird. Zudem konnten Autoantikörper gegen verschiedene Komponenten der Myelinschicht identifiziert werden. Zur Therapie der multiplen Sklerose wird momentan insbesondere rekombinant hergestelltes Interferon eingesetzt, insbesondere beim schubförmigen Krankheitsverlauf. Für die Behandlung einer schubförmigen MS gibt es bereits Ansätze einer Antikörper-basierten Therapie. So konnte bei dem Einsatz des Alemtuzumab (Campath®) in einer Studie eine Schubratenreduktion von 70% gezeigt werden. Allerdings waren hierbei bei 2% von 300 Probanden auch schwere Nebenwirkungen und ein Todesfall zu verzeichnen. Natalizumab (Tysabri®), welcher eine Reduktion der MS-Schübe von ca. 60% bewirkt und damit bessere Ergebnisse als eine IFN-Behandlung liefert, wird ebenfalls als ein Kandidat zur Behandlung von MS gehandelt, obwohl auch dieser Antikörper in drei Fällen von 1000 getesteten Probanden zum Tode führte und starke Nebenwirkungen aufwies.

Erst kürzlich konnte auch für MS ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von NKG2D-Liganden und ihrer Interaktion mit dem Rezeptor NKG2D im Humansystem *in vitro* gezeigt werden (Saikali et al., 2007). In der Studie von Saikali und Kollegen (2007) konnte durch den Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers *in vitro* eine NKG2D-vermittelte Lyse von humanen Oligodendrozyten durch NK- und CD8⁺-T-Zellen blockiert werden. Für eine präklinische Untersuchung der Wirksamkeit eines Anti-NKG2D Antikörpers bei MS *in vivo* existiert ein EAE (Experimental Allergic Encephalitis)-Modell, bei dem durch Injektion von Zellen, Gewebe oder speziellen Peptiden aus dem Nervensystem in Mäusen, Ratten, Kaninchen oder sogar Affen MS-ähnliche Symptome ausgelöst werden. Gleichzeitig mit der *in vitro* Studie mit humanen Immunzellen wurde in einem EAE-Mausmodell bei einem Einsatz eines Anti-NKG2D Antikörpers ein gegenteiliges Ergebnis erzielt. In diesem wurde gezeigt, dass durch eine Blockierung des NKG2D-Rezeptors und seiner Interaktion mit H60 regulatorische Funktionen von DCs unterbunden werden, welche möglicherweise bei einer Hsp70-induzierten EAE-Toleranz eine Rolle spielen (Galazka et al., 2007). Bei Betrachtung dieser unterschiedlichen

Ergebnisse stellt sich die berechtigte Frage, ob ein auf humanen Zellen basierendes *in vitro*-System nicht eine höhere Aussagekraft besitzt als Versuche in einem artifizialen *in vivo*-System einer anderen Spezies, zumal sich immer wieder bestätigt, dass Tiermodelle nur limitierend aussagekräftig sind, wenn sie eine Wirkung auf die menschliche Gesundheit widerspiegeln sollen (Hartung, 2008).

Ein mögliches humanes *in vitro*-System zur Überprüfung der Wirksamkeit der humanen Anti-hNKG2D Antikörper bei Autoimmunität könnte mit Hilfe von CD4⁺ CD28⁻ NKG2D⁺ T-Zellen aus RA-Patienten basierend auf dem ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay etabliert werden. Die Isolation und Kultivierung von CD4⁺ CD28⁻ NKG2D⁺ T-Zellen aus PBMCs von RA-Patienten wurde von Groh und Kollegen (2003) bereits beschrieben. Es besteht auch die Möglichkeit die Expression des NKG2D-Rezeptors durch den Einsatz der Zytokine IL-15 oder TNF- α , welche als proinflammatorische Mediatoren bei der Immunpathologie von RA eine zentrale Rolle spielen, bei CD4⁺ NKG2D⁻ T-Zellen aus gesunden Spendern zu induzieren. Für die Generierung potentieller Zielzellen der autoreaktiven CD4⁺ CD28⁻ NKG2D⁺ T-Zellen könnte auch eine Kultivierung von synovialen Fibroblasten aus RA-Patienten erfolgen (Groh et al., 2003).

Weiterhin könnte das Inhibierungspotential der Anti-hNKG2D Antikörper auch für MS getestet werden. Hierzu hatten Saikali und Kollegen (2007) bereits ein im ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay funktionierendes *in vitro*-System sowohl mit aktivierten humanen NK-Zellen als auch mit alloreaktiven CD8⁺ T-Zellen und humanen Oligodendrozyten etabliert. Hüe und Kollegen (2004) hatten für den Nachweis einer Beteiligung des NKG2D-Rezeptors an einer progressiven Pathogenese der Zöliakie ebenfalls ein auf dem ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay basierendes *in vitro*-Modell mit IEL und MICA-positiven Zielzellen bzw. P815-Zellen entwickelt. Dieses System könnte zusätzlich zur Überprüfung einer Anti-autoimmunen Wirksamkeit der Anti-hNKG2D Antikörper herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die humanen Antikörper nicht nur inhibitorische, sondern auch aktivierende Fähigkeiten aufweisen, die nach Kreuzvernetzung über Platten-Immobilisierung zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führten. Ähnliche Beobachtungen würden erst kürzlich von Lanier (2008) erwähnt. Es kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die Verwendung eines vollständigen IgG1 für die Bifunktionalität der Anti-hNKG2D Antikörper verantwortlich ist. Bei einer Therapie von Autoimmunerkrankungen wäre jedoch der Einsatz von Antikörpern wünschenswert, welche keine aktivierenden Effektorfunktionen mehr besitzen. Es könnten dann über den Antikörper die entsprechenden Protein-Protein-Interaktionen inhibiert werden, ohne dass es aufgrund des Fc-Teils zu einem unerwünschten proinflammatorischen Nebeneffekt käme. Allerdings kann zunächst keine der IgG Subklassen dieses Kriterium erfüllen, obwohl IgG2- und IgG4- in der Regel weniger aktiv

zu sein scheinen als IgG1- und IgG3-Antikörper (Clark, 1997). In einer Studie von Armour und Kollegen (1999) konnte dieses Problem durch die Mutation von ein oder zwei Schlüsselregionen der CH2-Domäne behoben werden. Hierbei wurden IgG1-Reste an den bestimmten Positionen durch IgG2-Reste ausgetauscht. Mit dieser Methode konnte die Bindung des IgG1-Fc-Teils an den Fc γ RI um das zehnfache herabgesetzt werden. Diese Form der Modifizierung vollständiger Antikörper ermöglicht die Beibehaltung des Fc-Teils und dessen Eigenschaft als Stabilisator der Halbwertszeit eines IgGs *in vivo* ohne unerwünschte Sekundäreffekte. Hierbei müsste zusätzlich beachtet werden, dass aufgrund der Mutationen die Bindung an den Fc-Rezeptor FcRn nicht herabgesetzt wird. Dieser ist an der Regulation von Antikörperkonzentrationen im Organismus beteiligt, indem er internalisierte Antikörper vor einem Degradationsprozess in Lysosomen aufgrund seiner Recycling-Funktion bewahrt. Eine reduzierte Bindung des Fc-Teils an den FcRn würde daher wieder zu einer kürzeren Halbwertszeit und somit zu einer schlechteren Pharmakokinetik des Antikörpers führen (Blumberg & Lencer, 2005; Vaccaro et al., 2005).

Eine andere Möglichkeit, die Effektorfunktion des Fc-Teils zu umgehen, wäre auf die Verwendung von Antikörper-Fragmenten wie scFv, Fab oder F(ab)₂ zurückzugreifen. Diese besitzen keinen Fc-Teil mehr, allerdings weisen sie aufgrund dessen auch eine deutlich geringere Halbwertszeit auf.

6. Zusammenfassung

Das NKG2D (Natural Killer Group 2 Member D)-Protein, ist ein aktivierender Rezeptor, der es NK- und CD8⁺ T-Zellen ermöglicht, infizierte oder transformierte körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Eine Fehlregulation dieses Rezeptors auf Immunzellen scheint jedoch auch zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie Typ I Diabetes, Zöliakie und RA zu führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein humaner Antikörper gegen hNKG2D für einen möglichen therapeutischen Einsatz bei Autoimmunerkrankungen generiert. Basierend auf den Sequenzen von schwerer (VH) und leichter Kette (VL) der murinen monoklonalen Antikörper 6H7 und 6E5A7, welche hNKG2D spezifisch binden und die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor blockieren, wurden scFv-Phagenbibliotheken hergestellt. Diese wurden anschließend zur Selektion im Phagen-Display eingesetzt. Der Humanisierungsprozess erfolgte hierbei mit Hilfe des Guided Selection-Verfahrens. Dazu wurde in einem ersten Phagen-Display-Durchgang die VH-Domäne des parentalen scFv mit einem humanen VL-Repertoire kombiniert. Die beiden daraus resultierenden humanen VL-Ketten wurden im darauf folgenden Schritt mit einem Repertoire an humanen VH-Domänen verknüpft. Da hierbei kein humaner rekombinanter scFv mit hNKG2D-Bindungsaktivität identifiziert werden konnte, musste eine schrittweise Humanisierung der Framework-Regionen (FR) der VH unter Beibehaltung der murinen CDR-Bereiche erfolgen. Diese führte zur Generierung des humanen scFv E1VLV71KVH, welcher neben den murinen CDR-Regionen lediglich noch drei Aminosäuren murinen Ursprungs im FR-Bereich besaß. Dessen biologische Aktivität wurde nach Konvertierung in das IgG1/ λ -Format in verschiedenen *in vitro*-Systemen analysiert. Anhand der Ergebnisse aus diesen Versuchen konnte ein deutlicher Verlust der Affinität und inhibitorischen Aktivität nach der Humanisierung festgestellt werden.

Die dadurch erforderliche Affinitätsmaturierung des E1VLV71KVH Antikörpers mittels sequentieller Randomisierung des CDR3-Bereichs von E1VL und V71KVH resultierte in fünf unterschiedlichen, hoch-affinen Anti-hNKG2D scFv. Zwei dieser generierten Konstrukte, B1VLB6VH und E4VLG10VH, wurden nach ihrer Herstellung als vollständige IgG1/ λ -Antikörper *in vitro* hinsichtlich ihrer Aktivierungs- und Neutralisierungsaktivität, sowie ihrer Stabilität und Internalisierung durch NK-Zellen untersucht. Beide Antikörper wiesen nach der Affinitätsmaturierung mit einem IC₅₀ von ca. $3,4 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$ ein wesentlich höheres Inhibitionspotential als der murine Ursprungsantikörper (ca. 3,3 $\mu\text{g/ml}$) auf und zeigten gegenüber Hitzeeinwirkung und Serumproteasen eine hohe Stabilität. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer

Untersuchungen konnten Internalisierungsvorgänge der Antikörper in die NK-Zelle beobachtet werden.

Für ein besseres Verständnis NKG2D-abhängiger Regulationsvorgänge und die Identifizierung NKG2D-spezifischer Zielgene wurde das Genexpressionsprofil von humanen NK-Zellen nach Interaktion mit dem NKG2D-Liganden ULBP-1Fc mittels Microarray untersucht. Infolge einer anschließenden Validierung der Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene konnten mittels RT-qPCR, FACS, ELISA und CBA NKG2D-spezifische Biomarker wie CRTAM, TNF α , IFN γ und GM-CSF etabliert werden. Ergänzend zu ⁵¹Cr-Freisetzung-Experimenten in zwei unterschiedlichen *in vitro* Zellkultursystemen ermöglichten diese Biomarker eine umfassende Charakterisierung neutralisierender und aktivierender Eigenschaften der beiden Antikörper B1VLB6VH und E4VLG10VH. Anhand dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass die humanen Anti-hNKG2D Antikörper eine ambivalente Funktionalität aufweisen. In Lösung sind sie in der Lage, NKG2D-induzierte CRTAM-Expression, Zellyse und Zytokinfreisetzung zu inhibieren. Nach Kreuzvernetzung des NKG2D-Rezeptors über an Platten immobilisierte Anti-hNKG2D Antikörper hingegen lassen sich aktivierende Eigenschaften wie Zellyse und Zytokinsekretion durch NK Zellen beobachten. Aufgrund ihrer ambivalenten Aktivität scheint ein therapeutischer Einsatz der beiden Antikörper bei humanen Autoimmunerkrankungen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit die Voraussetzungen geschaffen, um einen humanen, hoch affinen hNKG2D neutralisierenden Antikörper in einem letzten Schritt in ein besser geeignetes Antikörper-Format (scFv, Fab oder F(ab)₂) zu konvertieren.

7. Summary

The natural killer group 2, member D protein (NKG2D) is an activating receptor on NK- and CD8⁺ T-cells, which enables them to identify and eliminate infected and transformed somatic cells. However, a dysfunction of this receptor on immune cells may lead to the development of autoimmune diseases like type I diabetes, celiac disease, and rheumatoid arthritis.

In this doctoral thesis, a human antibody with anti-hNKG2D specificity was developed which could be of clinical relevance for the treatment of autoimmune diseases. Based on the sequences of heavy (VH) and light chain (VL) of the two murine monoclonal antibodies 6H7 and 6E5A7 which specifically bind to hNKG2D and block the interaction between NKG2D-ligand and receptor, scFv-phage-libraries were prepared. These libraries were used in the following selection process by phage-display and the humanization of the murine scFv was achieved by guided selection-technology. The VH domain of the parental scFv was first combined with a human VL-repertoire and the two resulting human light chains were then joined to a repertoire of human VH-domains. Because no recombinant human scFv with hNKG2D binding activity could be identified by this technique a stepwise humanization process of the VH framework-region (FR) had to be performed while retaining the murine CDR-domains. This procedure resulted in the human scFv E1VLV71KVH which in addition to the murine CDRs merely contained three amino acids of murine origin in the FR. The biological activity of the E1VLV71KVH was analyzed in different *in vitro*-systems after conversion of the scFv fragment into the completely human IgG1/ λ antibody format.

The results of these experiments revealed a noticeable loss of affinity and neutralizing function of the antibody after humanization and thus demonstrated the need for affinity maturation. Therefore, a sequential randomization of the CDR3 domains of E1VL and V71KVH was performed which resulted in five different anti-hNKG2D scFv fragments with high affinity.

Two of these human constructs, B1VLB6VH and E4VLG10VH, were produced as fully human IgG1/ λ antibodies and examined *in vitro* with regard to their activating and neutralizing activity as well as their stability and internalization effects by NK cells. After affinity maturation, both antibodies exhibited more potent inhibitory activity at IC₅₀ values of $3,4 \times 10^{-2}$ μ g/ml compared to the original murine antibody (3,3 μ g/ml) and showed a high rigidity to impact of heat and serum proteases. Internalization events of the antibodies by NK cells could be observed by fluorescence microscopic analysis.

For a better understanding of NKG2D-dependent regulation processes and the identification of NKG2D-specific target genes, the expression profile of ULBP-1Fc

stimulated human NK cells was determined using microarray technology. The microarray data were validated on both RNA- and protein-level using RT-qPCR, FACS, ELISA and CBA, and the following biological NKG2D-specific markers could be established: CRTAM, TNF α , IFN γ and GM-CSF. In addition to the execution of ^{51}Cr -release studies in two different *in vitro* cell culture systems these markers provided the basis for the characterization of the neutralizing and activating capacity of the human antibodies B1VLB6VH and E4VLG10VH. The findings of all these experiments indicated that the human anti-hNKG2D antibodies exhibit an ambivalent functionality: In solution the antibodies have the ability to inhibit NKG2D-specific CRTAM-Expression, cytolytic activity and cytokine release. However, cross-linking of NKG2D-receptor via plate-bound human anti-hNKG2D antibodies results in the induction of a cytolytic response and cytokine secretion by human NK cells. Due to the bifunctional activity of these two antibodies a therapeutic use in human autoimmune diseases does not seem to be feasible yet.

Taken together, this thesis has provided the basis for the conversion of a human hNKG2D neutralizing antibody with high affinity into a more suitable antibody format (scFv, Fab or F(ab) $_2$).

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Carb	Carbenicillin
CCL-3	CC Chemokin-Rezeptor Ligand-3
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region
CH	Konstante Region der schweren Antikörperkette (heavy chain)
CL	Konstante Region der leichten Antikörperkette (light chain)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
C-terminal	carboxyterminales Ende von Proteinen
CRTAM	Class I Restricted T Cell Associated Molecule
Da	Dalton
DAP10/12	DNAX-aktivierendes Protein von 10/12 kDa
DC	Dendritic Cells
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-nucleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC50	halbmaximale Effektorkonzentration
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E/T	Effector cell (E)/ Target cell (T)
Fab	Antigen binding fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter/Scan
Fc	Crystallizable fragment
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT-3L	Fms-Like Tyrosine Kinase Receptor-3 Ligand
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

FR	Framework Region
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	Glykosylphosphatidyl-Inositol
GvHD	Graft versus Host Disease
HA	Hämagglutinin
HAMA	Humane Anti-Maus Antikörper
HCMV	Human Cytomegalo Virus
hNKG2D	humanes NKG2D
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HIS	Histidin
hIL-2	humanes IL-2
IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICAM	Intercellular Adhaesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activating Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
JNK	c-Jun N-terminalen Kinasen
kDa	Kilodalton
KIR	Killer Cell Immunoglobulin Receptor
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mab	Monoclonal Antibody
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA/B	MHC Class I Chain-Related Antigen A bzw B
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1
mNKG2D	murines NKG2D
MS	Multiple Sklerose
NCR	Natural Cytotoxicity Receptors
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells
NF κ B	Nuclear factor κ B
NKG2D	Natural Killer Group 2 Member D
NKG2D-L	NKG2D long

NKG2D-S	NKG2D short
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKL	natürliche Killer Lymphom-Zellen
NTB-A	NK, T, B Zell Antigen
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming units
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PLC	Phospholipase
PMA	Phorbol Myristat Acetat
POD	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
RAE	Retinoic Acid Early Transcript
rek.	rekombinant
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rounds per minute
SAP	SLAM-Associated Protein
SCF	Stem Cell Factor
scFv	single-chain Fragment of variable domains
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFK	Src Family Kinases
SHP-1/2	SH2-domain containing phosphatase-1/2
SPR	Surface Plasmon Resonance
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
T1DM	Typ I Diabetes mellitus
TCR	T Cell Receptor
Tet	Tetracyclin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ULBP	UL-16 bindendes Protein

U	unit
VH	variable Region der schweren Antikörperkette (heavy chain)
VL	variable Region der leichten Antikörperkette (light chain)

Aminosäuren

A	Ala Alanin
C	Cys Cystein
D	Asp Asparaginsäure
E	Glu Glutaminsäure
F	Phe Phenylalanin
G	Gly Glycin
H	His Histidin
I	Ile Isoleucin
K	Lys Lysin
L	Leu Leucin
M	Met Methionin
N	Asn Asparagin
P	Pro Prolin
Q	Gln Glutamin
R	Arg Arginin
S	Ser Serin
T	Thr Threonin
V	Val Valin
W	Trp Tryptophan
Y	Tyr Tyrosin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

9. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., Samanta, A. & Feldmann, M. 2001. TNF-alpha. In: *Cytokine Reference* (Ed. by Feldmann, M.), pp. 414-434. London: Academic Press.
- Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. & Peter, M. E. 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, **22**, 207-20.
- Alizadeh, B. Z., Eerligh, P., van der Slik, A. R., Shastry, A., Zhernakova, A., Valdigem, G., Bruining, J. G., Sanjeevi, C. B., Wijmenga, C., Roep, B. O., et al. 2007. MICA marks additional risk factors for Type 1 diabetes on extended HLA haplotypes: an association and meta-analysis. *Mol Immunol*, **44**, 2806-12.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. 1997. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, **273**, 927-48.
- Almagro, J. C. & Fransson, J. 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci*, **13**, 1619-33.
- Andre, P., Castriconi, R., Espeli, M., Anfossi, N., Juarez, T., Hue, S., Conway, H., Romagne, F., Dondero, A., Nanni, M., et al. 2004. Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. *Eur J Immunol*, **34**, 961-71.
- Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A. D., Blumberg, R. S., Voss, S. D., Patel, A. T., Robertson, M. J., Nadler, L. M. & Freeman, G. J. 1998. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol*, **161**, 2780-90.
- Arase, N., Takeuchi, A., Unno, M., Hirano, S., Yokosuka, T., Arase, H. & Saito, T. 2005. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol*, **17**, 1227-37.
- Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. & Williamson, L. M. 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*, **29**, 2613-24.
- Aujame, L., Geoffroy, F. & Sodoyer, R. 1997. High affinity human antibodies by phage display. *Hum Antibod*, **8**, 155-168.
- Averdam, A., Kuhl, H., Sontag, M., Becker, T., Hughes, A. L., Reinhardt, R. & Walter, L. 2007. Genomics and diversity of the common marmoset monkey NK complex. *J Immunol*, **178**, 7151-61.
- Bahram, S., Inoko, H., Shiina, T. & Radosavljevic, M. 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol*, **17**, 505-9.
- Barbas, C. F., 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *PNAS*, **88**, 7978-82.
- Barber, A., Zhang, T., DeMars, L. R., Conejo-Garcia, J., Roby, K. F. & Sentman, C. L. 2007. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer. *Cancer Res*, **67**, 5003-8.
- Barber, A., Zhang, T. & Sentman, C. L. 2008. Immunotherapy with Chimeric NKG2D Receptors Leads to Long-Term Tumor-Free Survival and Development of Host Antitumor Immunity in Murine Ovarian Cancer. *J Immunol*, **180**, 72-8.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Spies, T. 1999. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*, **285**, 727-729.
- Berthebaud, M., Riviere, C., Jarrier, P., Foudi, A., Zhang, Y., Compagno, D., Galy, A., Vainchenker, W. & Louache, F. 2005. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood*, **106**, 2962-8.
- Bhat, R. & Watzl, C. 2007. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells - enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS ONE*, **2**, e326.

- Biassoni, R., Cantoni, C., Marras, D., Giron-Michel, J., Falco, M., Moretta, L. & Dimasi, N. 2003. Human Natural Killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med*, **7**, 376-387.
- Biassoni, R., Fogli, M., Cantoni, C., Costa, P., Conte, R., Koopman, G., Cafaro, A., Ensoli, B., Moretta, A., Moretta, L., et al. 2005. Molecular and functional characterization of NKG2D, NKp80, and NKG2C triggering NK cell receptors in rhesus and cynomolgus macaques: monitoring of NK cell function during simian HIV infection. *J Immunol*, **174**, 5695-705.
- Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J. & Leibson, P. J. 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol*, **4**, 557-64.
- Billiau, A. & Vandenberghe, K. 2001. IFN-gamma. In: *Cytokine Reference* (Ed. by Feldmann, M.), pp. 641-688. London: Academic Press.
- Blumberg, R. S. & Lencer, W. I. 2005. Antibodies in the breakdown lane. *Nat Biotechnol*, **23**, 1232-4.
- Boado, R. J., Zhang, Y. & Pardridge, W. M. 2007. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng*, **96**, 381-91.
- Boles, K. S., Barchet, W., Diacovo, T., Cella, M. & Colonna, M. 2005. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*, **106**, 779-86.
- Borrego, F., Kabat, J., Kima, D.-K., Lieto, L., Maashoa, K., Peña, J., Solana, R. & Coligan, J. E. 2001. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*, **38**, 637-660.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., et al. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, **198**, 557-67.
- Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M. & Moretta, A. 2004. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol*, **41**, 569-575.
- Brekke, O. H. & Sandlie, I. 2003. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 52-62.
- Bresson, D. & von Herrath, M. 2007. Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes: to combine or not to combine? *Autoimmun Rev*, **6**, 315-22.
- Brown, M. H., Boles, K., van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A. & Barclay, A. N. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med*, **188**, 2083-90.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. & Long, E. O. 2006a. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 73-91.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. & Long, E. O. 2006b. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, **107**, 159-66.
- Buckbinder, L., Velasco-Miguel, S., Chen, Y., Xu, N., Talbott, R., Gelbert, L., Gao, J., Seizinger, B. R., Gutkind, J. S. & Kley, N. 1997. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling. *PNAS*, **94**, 7868-72.
- Burgess, S. J., Maasho, K., Masilamani, M., Narayanan, S., Borrego, F. & Coligan, J. E. 2008. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*, **40**, 18-34.
- Caillat-Zucman, S. 2006. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol*, **67**, 204-7.

- Carayannopoulos, L. N., Naidenko, O. V., Fremont, D. H. & Yokoyama, W. M. 2002. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol*, **169**, 4079-83.
- Carter, P. J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, **6**, 343-57.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Chiesa, M. D., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. 2003. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *PNAS*, **100**, 4120-4125.
- Cella, M., Fujikawa, K., Tassi, I., Kim, S., Latinis, K., Nishi, S., Yokoyama, W., Colonna, M. & Swat, W. 2004. Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*, **200**, 817-23.
- Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*, **12**, 721-7.
- Cerwenka, A., Falk, C. S. & Watzl, C. 2007. NK cells—from basic research to cancer therapy. *Eur J Immunol*, **37**, 1161-4.
- Cerwenka, A. & Lanier, L. L. 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev*, **181**, 158-169.
- Chalupny, N. J., Rein-Weston, A., Dosch, S. & Cosman, D. 2006. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun*, **346**, 175-81.
- Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Lawrence, W. A., Rein-Weston, A. & Cosman, D. 2003. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun*, **305**, 129-35.
- Chen, X., Trivedi, P. P., Ge, B., Krzewski, K. & Strominger, J. L. 2007. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *PNAS*, **104**, 6329-34.
- Clark, M. R. 1997. IgG effector mechanisms. *Chem Immunol*, **65**, 88–110.
- Coffey, G. P., Stefanich, E., Palmieri, S., Eckert, R., Padilla-Eagar, J., Fielder, P. J. & Pippig, S. 2004. In vitro internalization, intracellular transport, and clearance of an anti-CD11a antibody (Raptiva) by human T-cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**, 896-904.
- Collins, R. W. M. 2004. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function to disease and Transplantation. *Eur J Immunogenet*, **31**, 105-114.
- Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., Turner, M., Ortaldo, J. R., Vivier, E., Tybulewicz, V. L. & Di Santo, J. P. 2002. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat Immunol*, **3**, 288-94.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, **22**, 633-40.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N. J. 2001. ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. *Immunity*, **14**, 123-133.
- Coudert, J. D., Scarpellino, L., Gros, F., Vivier, E. & Held, W. 2008. Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood*, **111**, 3571-8.
- Coudert, J. D., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M., Vivier, E. & Held, W. 2005. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood*, **106**, 1711-7.
- de Bono, J. S., Rha, S. Y., Stephenson, J., Schultes, B. C., Monroe, P., Eckhardt, G. S., Hammond, L. A., Whiteside, T. L., Nicodemus, C. F., Cermak, J. M., et al. 2004. Phase I trial of a murine antibody to MUC1 in patients with metastatic cancer: evidence for the activation of humoral and cellular antitumor immunity. *Ann Oncol*, **15**, 1825-33.

- Decker, E. L., Nehmann, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P. F. & Skerka, C. 2003. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res*, **31**, 911-21.
- DeNardo, G. L., Bradt, B. M., Mirick, G. R. & DeNardo, S. J. 2003a. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother*, **52**, 309-16.
- DeNardo, G. L., Mirick, G. R., Kroger, L. A., Bradt, B. M., Lamborn, K. R. & DeNardo, S. J. 2003b. Characterization of human IgG antimouse antibody in patients with B-cell malignancies. *Clin Cancer Res*, **9**, 4013S-21S.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N. & Raulet, D. H. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol*, **1**, 119-26.
- Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M. & Raulet, D. H. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, **413**, 165-171.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsla, J. K., Vivier, E. & Raulet, D. H. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, **3**, 1142-1149.
- Dübel, S., Rohrbach, P. & Schmiedl, A. 2004. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper. *Biol. Unserer Zeit*, **6**.
- Dunn, C., Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Dosch, S., Sivakumar, P. V., Johnson, D. C. & Cosman, D. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med*, **197**, 1427-39.
- Eagle, R. A. & Trowsdale, J. 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*, **7**, 737-44.
- Eleme, K., Taner, S. B., Önfelt, B., Collinson, L. M., McCann, F. E., Chalupny, N. J., Cosman, D., Colin, H., Magee, A. I. & Davis, D. M. 2004. Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D. *J Exp Med*, **199**, 1005-1010.
- Endt, J., McCann, F. E., Almeida, C. R., Urlaub, D., Leung, R., Pende, D., Davis, D. M. & Watzl, C. 2007. Inhibitory Receptor Signals Suppress Ligation-Induced Recruitment of NKG2D to GM1-Rich Membrane Domains at the Human NK Cell Immune Synapse. *J Immunol*, **178**, 5606-11.
- Fan, Z., Yu, P., Wang, Y., Fu, M. L., Liu, W., Sun, Y. & Fu, Y. X. 2006. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors. *Blood*, **107**, 1342-51.
- Finlin, B. S., Crump, S. M., Satin, J. & Andres, D. A. 2003. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *PNAS*, **100**, 14469-74.
- Fitch, J. C., Rollins, S., Matis, L., Alford, B., Aranki, S., Collard, C. D., Dewar, M., Eleftheriades, J., Hines, R., Kopf, G., et al. 1999. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation*, **100**, 2499-506.
- Flaig, R. M., Stark, S. & Watzl, C. 2004. Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol*, **172**, 6524-7.
- Foote, J. & Winter, G. 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*, **224**, 487-99.
- Friese, M. A., Platten, M., Lutz, S. Z., Naumann, U., Aulwurm, S., Bischo, F., Bühring, H.-J., Dichgans, J., Rammensee, H.-G., Steinle, A., et al. 2003. MICA/NKG2D-Mediated Immunogene Therapy of Experimental Gliomas. *Cancer Res*, **63**, 8996-9006.
- Fuchs, A. & Colonna, M. 2006. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol*, **16**, 359-66.

- Galazka, G., Jurewicz, A., Orłowski, W., Stasiolek, M., Brosnan, C. F., Raine, C. S. & Selmaj, K. 2007. EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J Immunol*, **179**, 4503-12.
- Gambelunghe, G., Brozzetti, A., Ghaderi, M., Candeloro, P., Tortoioli, C. & Falorni, A. 2007. MICA gene polymorphism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, **1110**, 92-8.
- Gambelunghe, G., Ghaderi, M., Cosentino, A., Falorni, A., Brunetti, P. & Sanjeevi, C. B. 2000. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. *Diabetologia*, **43**, 507-14.
- Gantz, I., Muraoka, A., Yang, Y. K., Samuelson, L. C., Zimmerman, E. M., Cook, H. & Yamada, T. 1997. Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis. *Genomics*, **42**, 462-6.
- Garrity, D., Call, M. E., Feng, J. & Wucherpfennig, K. W. 2005. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *PNAS*, **102**, 7641-6.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. & Raulet, D. H. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, **436**, 1186-90.
- Gasser, S. & Raulet, D. H. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 130-42.
- Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M. & Colonna, M. 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cells activation and costimulation. *Nat Immunol*, **3**, 1150-1155.
- Gonzalez, S., Groh, V. & Spies, T. 2006. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*, **298**, 121-38.
- Goronzy, J. J., Henel, G., Sawai, H., Singh, K., Lee, E. B., Pryshchep, S. & Weyand, C. M. 2005. Costimulatory pathways in rheumatoid synovitis and T-cell senescence. *Ann N Y Acad Sci*, **1062**, 182-94.
- Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. 2004. T-cell regulation in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, **16**, 212-7.
- Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. 2005. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, **204**, 55-73.
- Groh, V., Anja, B., El-Gabalawy, H., Nelson, J. L. & Thomas, S. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *PNAS*, **100**, 9452-9457.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M. & Spies, T. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *PNAS*, **93**, 12445-50.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. & Spies, T. 2001. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*, **2**, 255-260.
- Groh, V., Smythe, K., Dai, Z. & Spies, T. 2006. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol*, **7**, 755-62.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, **419**, 734-738.
- Groom, L. A., Sneddon, A. A., Alessi, D. R., Dowd, S. & Keyse, S. M. 1996. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J*, **15**, 3621-32.
- Gross, I., Bassit, B., Benezra, M. & Licht, J. D. 2001. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem*, **276**, 46460-8.
- Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R. A., Dzierzak, E. A., Blazar, B. R., Miller, J. S. & Verneris, M. R. 2006. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*, **108**, 3824-33.

- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. R. & Raulet, D. H. 2008. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, **28**, 571-80.
- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N. & López-Botet, M. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, **104**, 3664-71.
- Hagemann, D., Troppmair, J. & Rapp, U. R. 1999. Cot protooncogene protein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. *Oncogene*, **18**, 1391-400.
- Haley, P. J. 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, **188**, 49-71.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Matsumoto, K. & Nishida, E. 2004. Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. *J Biol Chem*, **279**, 22992-5.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T. & Nishida, E. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol*, **4**, 850-8.
- Hanna, J., Bechtel, P., Zhai, Y., Youssef, F., McLachlan, K. & Mandelboim, O. 2004a. Novel Insights on Human NK Cells: Immunological Modalities Revealed by Gene Expression Profiling. *J Immunol*, **173**, 6547-6563.
- Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T. I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K. W., Steinle, A., et al. 2004b. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest*, **114**, 1612-23.
- Hartung, T. 2008. Vor- und Nachdenkliches zu Tierversuchen. *ALTEX*, **25**, 10-16.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol*, **226**, 889-96.
- Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. 2006. NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin Immunol*, **18**, 176-85.
- Hayden, M. S., Gilliland, L. K. & Ledbetter, J. A. 1997. Antibody engineering. *Curr Opin Immunol*, **9**, 201-12.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, **16**, 216-229.
- Hershberger, R. E., Starling, R. C., Eisen, H. J., Bergh, C. H., Kormos, R. L., Love, R. B., Van Bakel, A., Gordon, R. D., Popat, R., Cockey, L., et al. 2005. Daclizumab to prevent rejection after cardiac transplantation. *N Engl J Med*, **352**, 2705-13.
- Hla, T. & Neilson, K. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *PNAS*, **89**, 7384-8.
- Ho, E. L., Carayannopoulos, L. N., Poursine-Laurent, J., Kinder, J., Plougastel, B., Smith, H. R. & Yokoyama, W. M. 2002. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol*, **169**, 3667-75.
- Hoet, R. M., Cohen, E. H., Kent, R. B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M., Pieters, H., et al. 2005. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol*, **23**, 344-8.
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*, **29**, 301-5.
- Holmdahl, R. 2000. Rheumatoid arthritis viewed using a headache paradigm. *Arthritis Res*, **2**, 169-171.
- Homey, B., Muller, A. & Zlotnik, A. 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol*, **2**, 175-84.
- Hoogenboom, H. R. 1997. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol*, **15**, 62-70.
- Hoogenboom, H. R. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*, **23**, 1105-16.

- Hoogenboom, H. R. & Chames, P. 2000. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today*, **21**, 371-8.
- Hornig, T., Bezbradica, J. S. & Medzhitov, R. 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol*, **8**, 1345-52.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C. & Bach, F. H. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, **173**, 1017-20.
- Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al. 2004. A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease. *Immunity*, **21**, 367-377.
- Hwang, W. Y. & Foote, J. 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, **36**, 3-10.
- Iniguez, M. A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J. M. & Fresno, M. 2000. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **275**, 23627-35.
- Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R. & Raulet, D. H. 2002. The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity*, **17**, 19-29.
- Jespers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G. & Hoogenboom, H. R. 1994. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)*, **12**, 899-903.
- Jinushi, M., Hodi, F. S. & Dranoff, G. 2006. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *PNAS*, **103**, 9190-5.
- Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y. & Hayashi, N. 2003. Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN- γ -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*, **170**, 1249-1256.
- Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, **268**, 9049-54.
- Kabat, E. A. & Wu, T. T. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*, **147**, 1709-19.
- Kang, A. S., Jones, T. M. & Burton, D. R. 1991. Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *PNAS*, **88**, 11120-3.
- Kang, N., Hamilton, S., Odili, J., Wilson, G. & Kupsch, J. 2000. In vivo targeting of malignant melanoma by 125Iodine- and 99mTechnetium-labeled single-chain Fv fragments against high molecular weight melanoma-associated antigen. *Clin Cancer Res*, **6**, 4921-31.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675-678.
- Kataoka, S., Konishi, Y., Nishio, Y., Fujikawa-Adachi, K. & Tominaga, A. 2004. Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol*, **23**, 549-60.
- Kennedy, J., Vicari, A. P., Saylor, V., Zurawski, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. & Zlotnik, A. 2000. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol*, **67**, 725-34.
- Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. 1975. 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, **5**, 112-117.

- Kim, D.-K., Kabat, J., Borrego, F., Sanni, T. B., You, C.-h. & Coligan, J. E. 2004. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Molecular Immunology*, **41**, 53-62.
- Kim, W. J., Kang, Y. J., Koh, E. M., Ahn, K. S., Cha, H. S. & Lee, W. H. 2005. LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages. *Immunology*, **114**, 272-9.
- Kirwan, S. E. & Burshtyn, D. N. 2007. Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol*, **19**, 46-54.
- Kjellev, S., Haase, C., Lundsgaard, D., Urso, B., Tornehave, D. & Markholst, H. 2007. Inhibition of NKG2D receptor function by antibody therapy attenuates transfer-induced colitis in SCID mice. *Eur J Immunol*, **37**, 1397-406.
- Köhler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-7.
- Konthur, Z. & Walter, G. 2002. Automation of phage display for high-throughput antibody development. *TARGETS*, **1**, 30-36.
- Krinner, Eva-Maria: Generierung humaner Antikörper-Spezifitäten zur Therapie entzündlicher Erkrankungen. Dissertation, Universität Würzburg, Micromet AG, 2006.
- Kubin, M., Cassiano, L., Chalupny, J., Chin, W., Cosman, D., Fanslow, W., Mullberg, J., Rousseau, A. M., Ulrich, D. & Armitage, R. 2001. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol*, **31**, 1428-37.
- Kveberg, L., Ryan, J. C., Rolstad, B. & Inngjerdingen, M. 2005. Expression of regulator of G protein signalling proteins in natural killer cells, and their modulation by Ly49A and Ly49D. *Immunology*, **115**, 358-65.
- Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**, 225-74.
- Lanier, L. L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, **9**, 495-502.
- Larson, S. M., El-Shirbiny, A. M., Divgi, C. R., Sgouros, G., Finn, R. D., Tschmelitsch, J., Picon, A., Whitlow, M., Schlom, J., Zhang, J., et al. 1997. Single chain antigen binding protein (sFv CC49): first human studies in colorectal carcinoma metastatic to liver. *Cancer*, **80**, 2458-68.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*, **157**, 4741-5.
- Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W. & Heo, D. S. 2004. Elevated TGF- β 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J Immunol*, **172**, 7335-7340.
- Li, C., Ge, B., Nicotra, M., Stern, J. N., Kopcow, H. D., Chen, X. & Strominger, J. L. 2008. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *PNAS*, **105**, 3017-22.
- Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T. & Strong, R. K. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*, **2**, 443-451.
- Lilienfeld, B. G., Garcia-Borges, C., Crew, M. D. & Seebach, J. D. 2006. Porcine UL16-binding protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D. *J Immunol*, **177**, 2146-52.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C. & Zhang, X. K. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, **116**, 527-40.
- Lin, E. Y., Orlofsky, A., Wang, H. G., Reed, J. C. & Prystowsky, M. B. 1996. A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, **87**, 983-92.
- Little, M., Kiprianov, S. M., Le Gall, F. & Moldenhauer, G. 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today*, **21**, 364-70.

- Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E. & Mercola, D. 1998. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther*, **5**, 3-28.
- Ljunggren, H. G. 2008. Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover. *Immunity*, **28**, 492-4.
- Ljunggren, H. G. & Kärre, K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med*, **162**, 1745-1759.
- Ljunggren, H. G. & Kärre, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, **11**, 237-44.
- Ljunggren, H. G. & Malmberg, K. J. 2007. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, **7**, 329-39.
- Long, E. O. 2002. Versatile signaling through NKG2D. *Nat Immunol*, **3**, 1119-20.
- Long, E. O. 2007. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity*, **26**, 385-7.
- Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Soto, A., Lopez-Vazquez, A. & Gonzalez, S. 2008. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*, **14**, 179-189.
- Maasho, K., Opoku-Anane, J., Marusina, A. I., Coligan, J. E. & Borrego, F. 2005. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol*, **174**, 4480-4.
- Martens, P. B., Goronzy, J. J., Schaid, D. & Weyand, C. M. 1997. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **40**, 1106-14.
- Martin-Pagola, A., Ortiz, L., Perez de Nanclares, G., Vitoria, J. C., Castano, L. & Bilbao, J. R. 2003. Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J Clin Immunol*, **23**, 498-503.
- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F. & Coligan, J. E. 2006. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J Immunol*, **177**, 3590-6.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552-4.
- McFarland, B. J., Kortemme, T., Yu, S. F., Baker, D. & Strong, R. K. 2003. Symmetry Recognizing Asymmetry: Analysis of the Interactions between the C-Type Lectin-like Immunoreceptor NKG2D and MHC Class I-like Ligands. *Structure*, **11**, 411-422.
- Melamed, J., Kernizan, S. & Walden, P. D. 2002. Expression of B-cell translocation gene 2 protein in normal human tissues. *Tissue Cell*, **34**, 28-32.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulet, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., et al. 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, **21**, 357-66.
- Mestas, J. & Hughes, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, **172**, 2731-8.
- Mincheva-Nilsson, L., Nagaeva, O., Chen, T., Stendahl, U., Antsiferova, J., Mogren, I., Hernestal, J. & Baranov, V. 2006. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol*, **176**, 3585-92.
- Mistry, A. R. & O'Callaghan, C. A. 2007. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology*, **121**, 439-47.
- Molinero, L. L., Domaica, C. I., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Rossi, L. E. & Zwirner, N. W. 2006. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol*, **67**, 170-82.
- Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Fainboim, L., Rabinovich, G. A. & Zwirner, N. W. 2003. Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *J Leukoc Biol*, **73**, 815-822.

- Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Fainboim, L., Rabinovich, G. A., Costas, M. A. & Zwirner, N. W. 2004. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol*, **173**, 5583-90.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, **19**, 197-223.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-73.
- Nakanishi, T., Tsumoto, K., Yokota, A., Kondo, H. & Kumagai, I. 2008. Critical contribution of VH-VL interaction to reshaping of an antibody: the case of humanization of anti-lysozyme antibody, HyHEL-10. *Protein Sci*, **17**, 261-70.
- Nausch, N., Florin, L., Hartenstein, B., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. & Cerwenka, A. 2006. Cutting edge: the AP-1 subunit JunB determines NK cell-mediated target cell killing by regulation of the NKG2D-ligand RAE-1epsilon. *J Immunol*, **176**, 7-11.
- Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R. A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S. & Davis, D. M. 2007. Reciprocal regulation of natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood*, **109**, 3776-85.
- Nicola, N. A. 2001. GM-CSF. In: *Cytokine Reference* (Ed. by Feldmann, M.), pp. 899-910. London: Academic Press.
- Nieto, M., Navarro, F., Perez-Villar, J. J., del Pozo, M. A., Gonzalez-Amaro, R., Mellado, M., Frade, J. M., Martinez, A. C., Lopez-Botet, M. & Sanchez-Madrid, F. 1998. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J Immunol*, **161**, 3330-9.
- Nikolova, M., Marie-Cardine, A., Boumsell, L. & Bensussan, A. 2002. BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int Immunol*, **14**, 445-51.
- O'Connor, W., Jr., Harton, J. A., Zhu, X., Linhoff, M. W. & Ting, J. P. 2003. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol*, **171**, 6329-33.
- Ogasawara, K., Benjamin, J., Takaki, R., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. 2005. Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol*, **6**, 938-45.
- Ogasawara, K., Hamerman, J. A., Ehrlich, L. R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J. A. & Lanier, L. L. 2004. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*, **20**, 757-67.
- Ohlin, M., Owman, H., Mach, M. & Borrebaeck, C. A. 1996. Light chain shuffling of a high affinity antibody results in a drift in epitope recognition. *Mol Immunol*, **33**, 47-56.
- Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., Girardi, M. & Hayday, A. C. 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*, **6**, 928-37.
- Pavlinkova, G., Colcher, D., Booth, B. J., Goel, A., Wittel, U. A. & Batra, S. K. 2001. Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs. *Int J Cancer*, **94**, 717-26.
- Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., et al. 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*, **31**, 1076-86.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.-C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., et al. 2002. 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 Research*, **62**, 6178-6185.

- Radaev, S., Kattah, M., Zou, Z., Colonna, M. & Sun, P. D. 2002. Making Sense of the Diverse Ligand Recognition by NKG2D. *J Immunol*, **169**, 6279-6285.
- Radaev, S., Rostro, B., Brooks, A. G., Colonna, M. & Sun, P. D. 2001. Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity*, **15**, 1039-49.
- Radaev, S. & Sun, P. D. 2003. Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **32**, 93-114.
- Raulet, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, **3**, 781-790.
- Raum, T., Gruber, R., Riethmuller, G. & Kufer, P. 2001. Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens. *Cancer Immunol Immunother*, **50**, 141-50.
- Rausch, A., Hessmann, M., Holscher, A., Schreiber, T., Bulfone-Paus, S., Ehlers, S. & Holscher, C. 2006. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. *Eur J Immunol*, **36**, 1156-67.
- Reichert, J. M., Rosensweig, C. J., Faden, L. B. & Dewitz, M. C. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol*, **23**, 1073-8.
- Robertson, M. J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*, **71**, 173-83.
- Roda, J. M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G. J., Tridandapani, S. & Carson, W. E., 3rd. 2006. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res*, **66**, 517-26.
- Roda-Navarro, P. & Reyburn, H. T. 2007. Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *Faseb J*, **21**, 1636-46.
- Roda-Navarro, P., Vales-Gomez, M., Chisholm, S. E. & Reyburn, H. T. 2006. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *PNAS*, **103**, 11258-63.
- Roep, B. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 Diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, **46**, 305-321.
- Roep, B. & Aktinson, M. 2004. Animal Models have little to teach us about Type 1 diabetes: 1. In support of this proposal. *Diabetologia*, **47**, 1650-1656.
- Rolle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Soderberg-Naucier, C., Cosman, D., Karre, K. & Cerboni, C. 2003. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol*, **171**, 902-8.
- Rosen, D. B., Araki, M., Hamerman, J. A., Chen, T., Yamamura, T. & Lanier, L. L. 2004. A Structural Basis for the Association of DAP12 with Mouse, but Not Human, NKG2D. *J Immunol*, **173**, 2470-2478.
- Rouault, J. P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Moyret-Lalle, C., Savatier, P., Pain, B., et al. 1996. Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet*, **14**, 482-6.
- Ryu, M. S., Lee, M. S., Hong, J. W., Hahn, T. R., Moon, E. & Lim, I. K. 2004. TIS21/BTG2/PC3 is expressed through PKC-delta pathway and inhibits binding of cyclin B1-Cdc2 and its activity, independent of p53 expression. *Exp Cell Res*, **299**, 159-70.
- Safford, M., Collins, S., Lutz, M. A., Allen, A., Huang, C. T., Kowalski, J., Blackford, A., Horton, M. R., Drake, C., Schwartz, R. H., et al. 2005. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol*, **6**, 472-80.
- Saikali, P., Antel, J. P., Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J. A. & Arbour, N. 2007. NKG2D-mediated cytotoxicity toward

- oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*, **27**, 1220-8.
- Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H.-G. & Steinle, A. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, **102**, 1389-1396.
- Salih, H. R., Goehlsdorf, D. & Steinle, A. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol*, **67**, 188-95.
- Salih, H. R., Rammensee, H.-G. & Steinle, A. 2002. Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J Immunol*, **169**, 4098-4102.
- Schmidt, D., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. 1996a. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest*, **97**, 2027-37.
- Schmidt, D., Martens, P. B., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. 1996b. The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *Mol Med*, **2**, 608-18.
- Schrader, J. W. 2001. IL-3. In: *Cytokine Reference* (Ed. by Feldmann, M.), pp. 855-859. London: Academic Press.
- Schrama, D., Reisfeld, R. A. & Becker, J. C. 2006a. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 147-59.
- Schrama, D., Terheyden, P., Otto, K., Kammerer, U., Brocker, E. B., Luhder, F., Cosman, D., Andersen, M. H. & Becker, J. C. 2006b. Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells. *Eur J Immunol*, **36**, 65-72.
- Shibuya, K., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Ochs, H. D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H. & Shibuya, A. 1999. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*, **11**, 615-23.
- Sidhu, S. S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F. A., Eigenbrot, C. & Fuh, G. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol*, **338**, 299-310.
- Simmons, M. J., Fan, G., Zong, W. X., Degenhardt, K., White, E. & Gelinas, C. 2008. Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene*, **27**, 1421-8.
- Smith, M. R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, **22**, 7359-68.
- Snyder, M. R., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. 2004. The double life of NK receptors: stimulation or co-stimulation? *Trends Immunol*, **25**, 25-32.
- Song, H., Kim, J., Cosman, D. & Choi, I. 2006. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol*, **239**, 22-30.
- Steinberger, P., Sutton, J. K., Rader, C., Elia, M. & Barbas, C. F., 3rd. 2000. Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization. *J Biol Chem*, **275**, 36073-8.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K. & Spies, T. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, **53**, 279-87.
- Stephens, H. A. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol*, **22**, 378-85.
- Stepniak, D. & Koning, F. 2006. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*, **67**, 460-8.
- Strieter, R. M., Standiford, T. J., Huffnagle, G. B., Colletti, L. M., Lukacs, N. W. & Kunkel, S. L. 1996. "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol*, **156**, 3583-6.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-78.
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J. & Cosman, D. 2001. The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev*, **181**, 185-92.

- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M. & Cosman, D. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*, **168**, 671-9.
- Sutherland, C. L., Rabinovich, B., Chalupny, N. J., Brawand, P., Miller, R. & Cosman, D. 2006. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15. *Blood*, **108**, 1313-9.
- Tazawa, R., Xu, X. M., Wu, K. K. & Wang, L. H. 1994. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **203**, 190-9.
- Ting, J. P. & Williams, K. L. 2005. The CATERPILLER family: an ancient family of immune/apoptotic proteins. *Clin Immunol*, **115**, 33-7.
- Tramontano, A., Chothia, C. & Lesk, A. M. 1990. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol*, **215**, 175-82.
- Tsatsanis, C., Patriotis, C., Bear, S. E. & Tsichlis, P. N. 1998. The Tpl-2 protooncogene protein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3827-32.
- Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D. & Leibson, P. J. 2006. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*, **7**, 524-532.
- Vaccaro, C., Zhou, J., Ober, R. J. & Ward, E. S. 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol*, **23**, 1283-8.
- Velasco-Sampayo, A. & Alemany, S. 2001. p27kip protein levels and E2F activity are targets of Cot kinase during G1 phase progression in T cells. *J Immunol*, **166**, 6084-90.
- Violle, T., Krones-Herzig, A., Baron, V., De Gregorio, G., Adamson, E. D. & Mercola, D. 2003. Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J Biol Chem*, **278**, 11802-10.
- Vivier, E., Nune's, J. A. & Vély, F. 2004. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science*, **306**, 1517-1519.
- von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., et al. 2006. A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood*, **107**, 1955-62.
- Waldhauer, I. & Steinle, A. 2006. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*, **66**, 2520-6.
- Wang, Y. G., Kim, K. D., Wang, J., Yu, P. & Fu, Y. X. 2005. Stimulating lymphotoxin beta receptor on the dendritic cells is critical for their homeostasis and expansion. *J Immunol*, **175**, 6997-7002.
- Ware, C. F. 2001. LIGHT. In: *Cytokine Reference* (Ed. by Feldmann, M.), pp. 513-519. London: Academic Press.
- Watkins, N. A. & Ouwehand, W. H. 2000. Introduction to antibody engineering and phage display. *Vox Sang*, **78**, 72-9.
- Watzl, C. 2003. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect*, **5**, 31-7.
- Watzl, C. & Long, E. O. 2003. Natural Killer Cell Inhibitory Receptors Block Actin Cytoskeleton-dependent Recruitment of 2B4 (CD244) to Lipid Rafts. *J Exp Med*, **197**, 77-85.

- Weisman, M. H., Moreland, L. W., Furst, D. E., Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Paulus, H. E., Teoh, L. S., Velagapudi, R. B., Noertersheuser, P. A., Granneman, G. R., et al. 2003. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther*, **25**, 1700-21.
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I. & Steinle, A. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*, **7**, 1334-42.
- Welte, S. A., Sinzger, C., Lutz, S. Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K. L., Eknigk, U., Rammensee, H. G. & Steinle, A. 2003. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol*, **33**, 194-203.
- Wendt, K., Wilk, E., Buyny, S., Buer, J., Schmidt, R., E. & Jacobs, R. 2006. Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56dim and CD56bright NK cells. *J Leukoc Biol*, **80**, 1529-1541.
- Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I. & Borst, J. 2002. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem*, **277**, 22781-8.
- Wieland, G. D., Nehmann, N., Muller, D., Eibel, H., Siebenlist, U., Suhnel, J., Zipfel, P. F. & Skerka, C. 2005. Early growth response proteins EGR-4 and EGR-3 interact with immune inflammatory mediators NF-kappaB p50 and p65. *J Cell Sci*, **118**, 3203-12.
- Wiemann, K., Mittrucker, H. W., Feger, U., Welte, S. A., Yokoyama, W. M., Spies, T., Rammensee, H. G. & Steinle, A. 2005. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol*, **175**, 720-9.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W. D. & Watkins, J. D. 1999a. Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J Mol Biol*, **294**, 151-62.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B. H., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. 1999b. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science*, **285**, 730-732.
- Xu, J. L. & Davis, M. M. 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*, **13**, 37-45.
- Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H. K. & Datta, S. K. 2004. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med*, **10**, 411-5.
- Yang, Y. & Santamaria, P. 2006. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)*, **110**, 627-39.
- Yin, Y., Liu, Y. X., Jin, Y. J., Hall, E. J. & Barrett, J. C. 2003. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, **422**, 527-31.
- Zhang, T., Lemoij, B. A. & Sentman, C. L. 2005. Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood*, **106**, 1544-51.
- Zhang, Y. & Stastny, P. 2006. MICA antigens stimulate T cell proliferation and cell-mediated cytotoxicity. *Hum Immunol*, **67**, 215-22.
- Zhou, H., Luo, Y., Kaplan, C. D., Kruger, J. A., Lee, S. H., Xiang, R. & Reisfeld, R. A. 2006. A DNA-based cancer vaccine enhances lymphocyte cross talk by engaging the NKG2D receptor. *Blood*, **107**, 3251-7.
- Zhou, H., Luo, Y., Lo, J. F., Kaplan, C. D., Mizutani, M., Mizutani, N., Lee, J. D., Primus, F. J., Becker, J. C., Xiang, R., et al. 2005. DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *PNAS*, **102**, 10846-51.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, **12**, 121-7.

- Zompi, S., Hamerman, J. A., Ogasawara, K., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. J., Di Santo, J. P., Lanier, L. L. & Colucci, F. 2003. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol*, **4**, 565-572.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jutta Steigerwald
 Geburtsdatum: 06.03.1979
 Geburtsort: Erlenbach am Main
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Bildungsweg

1985-1989 Grundschole Hösbach-Rottenberg

1989-1998 Karl-Theodor-von-Dalberg-Gymnasium Aschaffenburg, Abschluss: Abitur

1998-2004 **Studium der Biologie** an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg mit den Studienschwerpunkten: Mikrobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie und Genetik

Mai 2003 – Mai 2004 **Diplomarbeit** am Institut für molekulare Infektionsbiologie (IMIB) in Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Heidrun Moll mit dem Thema: „Die Charakterisierung der parasitophoren Vakuole von *Leishmania major*-infizierten dendritischen Zellen“
 Abschluss: Biologie-Diplom

Oktober 2004 **Dissertation** bei der Micromet AG in München unter Betreuung von Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle mit dem Thema: „Der NK-Zellrezeptor NKG2D als Zielstruktur für eine Antikörper-basierte therapeutische Immunmodulation“. Betreuung an der biologischen Fakultät der Universität Würzburg durch Prof. Dr. Michael Kuhn.

Fortbildungen

März 2007 – April 2008 Weiterbildung zur Natur- und Umweltpädagogin, veranstaltet vom evangelischen Bildungswerk Regensburg e.V. und vom Landesbund für Vogelschutz in Bayern e.V.

Anstellungen

seit Oktober 2004 PhD-Studentin bei der Micromet AG in München

seit April 2008 Natur- und Umweltpädagogin bei Ökoprosjekt-MobilSpiel e.V. in München

Publikationen

Jutta Steigerwald, Tobias Raum, Stefan Pflanz, Ronny Cierpka, Susanne Mangold, Doris Rau, Patrick Hoffmann, Majk Kvesic, Christina Zube, Stefanie Linnerbauer, John Lumsden, Mirnaalini Sriskandarajah, Peter Kufer, Patrick A. Baeuerle, Jörg Volkland (2008): **Human IgG1 Antibodies Antagonizing Activating Receptor NKG2D on Natural Killer Cells.**

(Zur Publikation eingereicht bei Molecular Immunology)

Jutta Steigerwald, Stefan Pflanz, Roland Lang, Jörg Mages, Angela Servatius, Patrick A. Baeuerle, Jörg Volkland (2008): **Microarray analysis of the expression profiles of human NK cells in response to the NKG2D ligand ULBP-1.**

(Manuskript in Vorbereitung)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Dissertation bei der Micromet AG in München durchgeführt. Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Kuhn möchte ich mich recht herzlich für die Bereitschaft bedanken, als Gutachter dieser Arbeit vor der biologischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg einzutreten.

Bei der Micromet AG bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas. Ein Dank auch an Herrn Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle für seine fachliche Betreuung, für die Korrektur des Manuskriptes und die Erstellung des Gutachtens.

Meinem ehemaligen Laborleiter Dr. Stefan Pflanz danke ich für die Einarbeitung in die Thematik, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung mit zahlreichen Ideen. Ich wünsche ihm und seiner Familie auf diesem Weg alles Gute und weiterhin viel Erfolg in seinem Labor in San Francisco.

Mein besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Laborleiter Dr. Jörg Volkland, der sich trotz seines firmeninternen Wechsels in das Projekt Management dazu bereit erklärt hat, meine Dissertation bis zur Beendigung weiter zu betreuen. Für das stete Engagement und Interesse an dieser Arbeit, unzählige Diskussionen, die konstruktive Korrektur meiner Arbeit, die ansteckend gute Laune und Motivation vielen Dank!

Ein Dank auch an den Rest der ehemaligen Arbeitsgruppe: John Lumsden, Steffi Linnerbauer und Claudia Anetzberger – Danke euch allen für eure tatkräftige Unterstützung, die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und viele schöne Unternehmungen nach Feierabend!

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die enge Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Raum und seiner Arbeitsgruppe, die mich während der Durchführung des Phagen-Displays und des Biacores unter ihre Fittiche genommen haben. In diesem Sinne vielen herzlichen Dank an Dr. Doris Rau, Ronny Cierpka, Susanne Mangold und Majk Kvesic für ihre ausgezeichnete Zusammenarbeit. Dr. Tobias Raum nochmals vielen Dank für die sorgfältige Korrektur der Dissertation.

Vielen Dank auch an Patrick Hoffmann für die fachliche Betreuung bei der PEGylierung von Proteinen, der Konjugation von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen und die Einweisung im Umgang mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Mirnaalini Sriskandarajah und Petra Mayer danke ich für ihre Hilfe bei der Aufreinigung von Proteinen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen beiden Labornachbarinnen Carola Steiger und Susanne Weinberger, die während meiner Doktorarbeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich mit Rat und seelischem Beistand unterstützt haben.

Die außerordentlich guten Bedingungen bei Micromet, die freundliche Atmosphäre, die exzellenten Mitarbeiter und die wohlwollende Unterstützung haben mir meine Zeit als Doktorandin in München sehr angenehm gemacht. Vielen Dank! Es war eine schöne Zeit bei euch!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der „Affymetrix core facility“ am Institut für medizinische Mikrobiologie der TU München Dr. Roland Lang, Dr. Jörg Mages und Angela Servatius für die Durchführung und statistische Auswertung der Microarray-Studien.

Die konfokalen Laser Scanning mikroskopischen Aufnahmen sind am Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie (Zoologie II) des Biozentrums der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit einer langjährigen Freundin, Dipl. Biologin Christina Zube (Arbeitsgruppe Rössler), entstanden. Ihr auf diesem Wege noch mal ganz herzlichen Dank für den netten Tag am Mikroskop und die Einführung in die Untiefen der Amira Software.

Ganz besonders möchte ich mich bei Martin, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich all die Jahre unterstützt und aufgemuntert haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den 16.09.2008

Jutta Steigerwald