

Aus der
Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik
Klinische Kooperationseinheit Translationale
Immunologie

**Ein Fc-optimierter CD133 Antikörper zur Induktion einer
Immunantwort natürlicher Killerzellen gegen das
kolorektale Karzinom und die akute lymphatische
Leukämie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Riegg, Fabian Alexander

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Leibold

3. Berichterstatter: Professor Dr. M. Radsak

Tag der Disputation: 29.04.2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	13
1.1 <i>Das Immunsystem.....</i>	13
1.2 <i>Die NK Zelle</i>	16
1.3 <i>Tumorimmunologie.....</i>	18
1.4 <i>Immuntherapie.....</i>	19
1.5 <i>Antikörper</i>	22
1.6 <i>Kolorektales Karzinom</i>	27
1.7 <i>Akute lymphatische B-Zell Leukämie (B-ALL).....</i>	29
1.8 <i>CD133</i>	32
1.9 <i>Zielsetzung dieser Arbeit.....</i>	35
2 Material und Methoden.....	36
2.1 <i>Material.....</i>	36
2.2 <i>Methoden.....</i>	42
3 Ergebnisse	54
3.1 <i>Bindung muriner CD133 Antikörperklone auf KRK-Zelllinien.....</i>	54
3.2 <i>Charakterisierung des Fc-optimierten CD133 Antikörpers 293C3-SDIE</i>	56
3.3 <i>Direkte Effekte von 293C3-SDIE auf die Proliferation / Viabilität von KRK-Zelllinien .</i>	60
3.4 <i>Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE.....</i>	63
3.5 <i>Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE</i>	66
3.6 <i>Charakterisierung von 293C3-SDIE auf B-ALL-Zellen.....</i>	67
3.7 <i>Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen B-ALL-Zelllinien durch 293C3-SDIE</i>	70
3.8 <i>Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen B-ALL-Zelllinien durch 293C3-SDIE.....</i>	71
3.9 <i>Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen primäre B-ALL-Zellen durch 293C3-SDIE ..</i>	73
3.10 <i>Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen primäre B-ALL-Zellen durch 293C3-SDIE</i>	74
4 Diskussion.....	76
5 Zusammenfassung	85
6 Publikationen	87
7 Literaturverzeichnis.....	88
8 Erklärung zum Eigenanteil.....	102
9 Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Abbildung eines humanen IgG1 Antikörpers.	22
Abbildung 2:	Schematische Abbildung der CD133 Struktur.	33
Abbildung 3:	Bestimmung der relativen CD133 mRNA Expression in drei KRK-Zelllinien.	54
Abbildung 4:	Titration der murinen CD133 Antikörperklone auf Caco-2 Zellen.	55
Abbildung 5:	Vergleich muriner CD133 Antikörperklone auf drei KRK-Zelllinien.	56
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Fc-optimierten Antikörpers 293C3-SDIE.	57
Abbildung 7:	Charakterisierung der Spezifität von 293C3-SDIE.	58
Abbildung 8:	Vergleichende Bindungstitration von 293C3-SDIE mit dem murinen CD133 Antikörperklon 293C3.	58
Abbildung 9:	Titration des Antikörpers 293C3-SDIE auf drei KRK-Zelllinien.	59
Abbildung 10:	Expression von EGFR auf KRK-Zelllinien.	60
Abbildung 11:	Direkte Antikörperwirkung von 293C3-SDIE auf die Proliferation / Viabilität von KRK-Zelllinien.	62
Abbildung 12:	Induktion von NK Zell-Aktivität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE.	63
Abbildung 13:	Induktion von NK Zell-Degranulation nach 293C3-SDIE Behandlung von KRK-Zelllinien.	64
Abbildung 14:	Induktion von Interferon- γ Bildung durch 293C3-SDIE.	65
Abbildung 15:	Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen KRK-Zelllinien.	66
Abbildung 16:	Vergleich muriner CD133 Antikörperklone auf B-ALL Zellen.	67
Abbildung 17:	Titration des Antikörpers 293C3-SDIE auf B-ALL-Zellen.	68
Abbildung 18:	Expression von CD133 auf primären B-ALL-Zellen.	69

Abbildung 19: Induktion von NK Zell-Reaktivität durch 293C3-SDIE gegen B-ALL-Zelllinien.	71
Abbildung 20: Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen B-ALL-Zelllinien.	72
Abbildung 21: Induktion von NK Zell-Reaktivität durch 293C3-SDIE gegen primäre B-ALL-Zellen.	73
Abbildung 22: Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen primäre B-ALL-Zellen.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristika der funktionell verwendeten KRK-Zelllinien	61
Tabelle 2:	Charakteristika der funktionell verwendeten B-ALL-Zelllinien	70
Tabelle 3:	Charakteristika der funktionell verwendeten primären B-ALL-Proben	70

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis
ALL	Akute lymphatische Leukämie/n
AML	Akute myeloische Leukämie/n
APC	Antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin
BATDA	2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylacid acetoxymethylester
BCR	B-cell receptor
BCR-ABL	Breakpoint cluster region; Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BiTE	Bispecific T-cell engager
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
BV421	Brilliant Violet 421
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CDR	Complementarity determining region
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFU	Colony forming units
C _H	Constant heavy
CHO	Chinese Hamster Ovary
C _L	Constant light
CPI	Checkpoint-Inhibitoren
CR	Complete remission

Cy7	Cyanin 7
ddH2O	Double distilled H ₂ O
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DZ	Dendritische Zelle/n
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor/s
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E:T	Effector to target ratio, Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
Fc	Fragment crystallizable
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein
FLT3	FMS-related tyrosine kinase 3
FR	Framework region
FSC	Vorwärtsstreulicht
G418	Geneticin
GMALL	German-Multicenter-ALL
h	Stunde
HAMA	Human anti-mouse antibodies
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove Modified Dulbecco Media
INF-α	Interferon-alpha

ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kDa	Kilodalton
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors
KM	Knochenmark
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein-1
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAC	Membrane attack complex
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
MICA/MICB	MHC class I chain-related protein A/B
min	Minute
ml	Milliliter
MLL	Mixed lineage leukemia
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSI	Mikrosatelliten-instabil
MSS	Mikrosatelliten-stabil
NK	Natürliche Killer
NKT	Natürliche Killer T
NKG2D	Natural killer group 2 member D
ns	nicht signifikant
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PB	peripheres Blut
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed death protein 1

PD-L1	Programmed death-ligand 1
PE	Phycoerythrin
Plt	Thrombozyten
PPR	Pattern recognition receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
u. a.	unter anderem
r/r	rezidivierter/refraktärer
RAS	Rat sarcoma
RNA	ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDIE	S239D/I332E
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFI	spezifischer Fluoreszenzindex
SSC	Seitwärtsstreulicht
t	Translokation
tan	Tandem
TCR	T-cell receptor
TGF- β	Transforming growth factor β
TIGIT	T cell immunoglobulin and ITIM domain
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodes, Metastasis
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
ULPB	UL16-binding protein
v	variabel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
V _H	Variable heavy

V _L	Variable light
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
*	signifikant

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unter dem Immunsystem (lat. immunis: „rein“, „frei“, „unberührt“) versteht man ein interaktives Netzwerk aus physikalischen Barrieren, lymphatischen Organen, spezialisierten Zellen und Molekülen, dessen Aufgabe es ist, höhere Organismen vor Bedrohungen durch schädliche Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu schützen. Zusätzlich ist das Immunsystem auch an der Eliminierung maligne entarteter körpereigener Zellen beteiligt. Vier Funktionen sind dabei von zentraler Bedeutung¹⁻⁴:

- 1) die immunologische Erkennung
- 2) die immunologische Effektorfunktion
- 3) die Immunregulation und
- 4) das immunologische Gedächtnis.

1.1.1 Zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen zellulären und humoralen Anteilen des Immunsystems. Der zelluläre Anteil besteht aus Leukozyten, die sich in der Hämatopoese aus im Knochenmark (KM) befindlichen pluripotenten Stammzellen differenzieren. Aus diesen Stammzellen entstehen myeloische Vorläuferzellen, die sich wiederum zu Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DZ) und Mastzellen entwickeln. Ebenfalls aus pluripotenten Stammzellen entstehende lymphatische Vorläuferzellen differenzieren sich in B-, T- und Natürliche Killer (NK)-Zellen. Dem humoralen Immunsystem ordnet man eine Vielzahl an der Immunreaktion beteiligte lösliche Faktoren zu wie u. a. Komplementproteine, Zytokine, akute Phase Proteine und Antikörper¹⁻⁵.

1.1.2 Das angeborene Immunsystem

Ein weiteres Merkmal des Immunsystems ist die Einteilung in die angeborene und adaptive Immunität. Das angeborene Immunsystem reagiert innerhalb von Minuten und ist die erste Verteidigungslinie der Immunabwehr⁴. Allgemein definiert zeichnet es sich durch Abwehrmechanismen aus, die in ihren reifen

funktionellen Formen in Keimbahngenen kodiert sind⁶.

Zu den wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören physikalische Barrieren (Haut, Epithelien), antimikrobielle Peptide (Defensine, Lysozyme), Zytokine, Serumproteine (Komplementfaktoren, C-reaktives Protein, Lektine) und Immunzellen (Phagozyten darunter dendritische Zellen (DZ), Monozyten und neutrophile Granulozyten sowie Mastzellen und NK Zellen)^{1,2,7}. Insbesondere Phagozyten haben durch die von ihnen exprimierten *Pattern Recognition Receptors* (PRR) eine essenzielle Rolle. PRR (bspw. Toll-like Rezeptoren) sind keimbahnkodierte Rezeptoren, die konservierte Strukturproteine von Pathogenen, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), binden^{3,8-10}. Erkannte Pathogene können daraufhin phagozytiert und enzymatisch verdaut werden. Zusätzlich kommt es zur Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch die Phagozyten. Dadurch wird eine Entzündungsantwort initiiert und weitere Immunzellen des angeboren und adaptiven Immunsystems werden angelockt^{2,11}. Zentrales Bindeglied zur adaptiven Immunantwort sind dendritische Zellen. Sie nehmen Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie T-Zellen in Lymphorganen¹². Das angeborene Immunsystem ist jedoch nicht nur an Abwehrprozessen gegen Mikroorganismen beteiligt. So sind vor allem NK Zellen zentral an der Erkennung und Elimination von malignen Zellen beteiligt⁴. In Kapitel 1.2 wird dies näher betrachtet.

1.1.3 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zu den keimbahnkodierten Mechanismen des angeborenen Immunsystems zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch angepasste, spezifischere Immunreaktionen aus, die zeitlich verzögert stattfinden. Zusätzlich ist eine ausgeprägtere immunologische Gedächtnisbildung möglich, die bei erneutem Kontakt zu einem bereits bekannten Zielantigen eine schnellere und effektivere Immunreaktion sicherstellt⁶.

Basis der Immunreaktionen des adaptiven Immunsystems sind Antigen-spezifische Rezeptoren, die auf den Oberflächen von T- und B-Lymphozyten exprimiert werden. Sowohl T-Zell Rezeptoren (TCR) als auch B-Zell Rezeptoren

(BCR, gebundene Immunglobuline) entstehen durch eine irreversible, somatische Umlagerung von einigen hundert Keimbahn-Genelementen während der individuellen Zellentwicklung. Dadurch wird es möglich, Millionen verschiedene T- und B-Lymphozyten und lösliche Immunglobuline mit einzigartiger Spezifität zu bilden^{6,13,14}. Essenziell für eine effektive Immunantwort ist es, aus diesem Repertoire an Möglichkeiten diejenigen auszuwählen, die zur aktuellen Bedrohung passen⁶. Dafür gibt es festgelegte Aktivierungsmuster. Die Hauptklasse von T-Zellen sind $\alpha\beta$ T-Zellen. Diese bekommen über ihren TCR Peptidfragmente präsentiert, die an *Major histocompatibility complex* (MHC) II Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) oder MHC I Molekülen körpereigener Zellen gebunden sind¹⁵. APCs, wie z. B. DZ, präsentieren Peptidfragmente von phagozytierten, prozessierten Pathogenen, wohingegen nahezu alle Körperzellen dauerhaft Peptidfragmente zelleigener Proteine präsentieren. Dieser Unterschied spiegelt sich in zwei Hauptgruppen von $\alpha\beta$ T-Zellen mit unterschiedlichen Korezeptoren wider¹: $CD4^+$ T-Zellen erkennen Peptide auf MHC II Molekülen und differenzieren sich zu T-Helfer Zellen. Diese können wiederum durch die Bildung von Zytokinen die Immunantwort unterstützen und die Reifung von B-Zellen stimulieren^{4,16,17}. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptide auf MHC I Molekülen. Sie können zu zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen differenzieren und dann Virus-infizierte oder maligne Zellen lysieren⁴. Die Aktivierung und folgende Differenzierung von T-Zellen benötigt neben der Erkennung von MHC gebunden Peptiden durch den TCR noch die zusätzliche Partizipation von costimulatorischen Molekülen (z. B. CD28 und CD80/86)¹⁸.

$CD4^+$ T-Helferzellen sind auch an der Reifung von naiven B-Zellen beteiligt. Über den BCR erkennen B-Zellen Antigene, internalisieren sie und präsentieren diese über MHC II den $CD4^+$ T-Helferzellen, die bereits Kontakt zu dem Antigen hatten. U. a. durch diesen Kontakt können B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen reifen^{4,6,19,20}. Antikörper gehören zu den essenziellsten, humoralen Faktoren des adaptiven Immunsystems und werden in ihrer Funktion in Kapitel 1.5 erklärt.

1.2 Die NK Zelle

Im Kontext der Erforschung der T-Zell medierten Zytotoxizität wurde 1975 von Kiessling et al. eine bis dato unbekannte Lymphozyten Population in der Maus beschrieben. Diese Zellpopulation hatte die Eigenschaft, eine „natürliche“ Zytotoxizität zu zeigen, die im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen keine vorhergehende Antigen-Sensibilisierung benötigt, um Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Um dieser Eigenschaft Rechnung zu tragen, nannte man diese Zellen natürliche Killerzellen und ordnete sie dem angeborenen Immunsystem zu²¹⁻²³. Heute ist bekannt, dass NK Zellen auch Merkmale des adaptiven Immunsystems haben. Dazu zählt man ein variables Rezeptorrepertoire und die Möglichkeit der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses²⁴⁻²⁶.

Ca. 5 – 15% der zirkulierenden Lymphozyten im Menschen sind NK Zellen^{4,27}. Humane NK Zellen besitzen im Gegensatz zu T- und NKT-Zellen keine T-Zell-Rezeptoren (TCR) und kein CD3. Die meisten NK Zellen exprimieren CD56^{28,29}. Mithilfe des relativen Expressionsniveaus von CD56 sowie CD16 kann man zwei große Subpopulationen von NK Zellen unterscheiden: CD56^{bright}CD16^{dim} NK Zellen kommen vorwiegend im lymphatischen Gewebe vor und sezernieren immunmodulatorische Zytokine (z. B. Interferon- γ (IFN- γ)). CD56^{dim}CD16^{bright} NK Zellen kommen vermehrt im peripheren Blut (PB) vor und ihnen werden eher zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben^{4,30,31}. Neuere Studien zeigen jedoch, dass diese Aufteilung nur eine sehr grobe Vereinfachung darstellt. Es scheint eine große Diversität an verschiedenen NK Zell Phänotypen zu geben, die sich in verschiedenen Geweben und im Blut unterscheiden^{32,33}.

1.2.1 Missing-self und induced-self Hypothese

NK Zellen nutzen verschiedene Signale, mit denen sie gesunde Zellen von Zielzellen unterscheiden können. Die Aktivierung von NK Zellen kann deshalb als komplexe Integration von Signalen inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren verstanden werden²⁷. Hierzu wurden zwei Hypothesen aufgestellt. Die „missing-self“ Hypothese besagt, dass NK Zellen körpereigene Zellen lysieren, wenn bestimmte Signalproteine (u. a. MHC-I) auf der Oberfläche nicht

oder in verringerter Menge vorhanden sind^{2,34-36}. Hierfür exprimieren humane NK Zellen inhibitorische Rezeptoren bspw. der KIR-Familie (*killer immunoglobulin-like receptor*), die MHC-I Moleküle erkennen³⁷. Insbesondere maligne transformierte Zellen, welche häufig eine deutlich reduzierte Expression von MHC-I Molekülen aufweisen, können so von NK Zellen erkannt werden³⁸. Allerdings exprimieren Erythrozyten ebenfalls keine MHC-I Moleküle und werden nicht lysiert. Somit kann eine „missing-self“ Erkennung nicht allein zu einer Aktivierung von NK Zellen führen. Ergänzt wurde deshalb die „induced-self“ Hypothese. Sie besagt, dass zellulär gestresste oder maligne transformierte Zellen zusätzlich aktivierende Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren, die von NK Zellen erkannt werden^{2,39,40}. Ein aktivierender Rezeptor, der diese Signale erkennt, ist z. B. der NKG2D Rezeptor (*natural killer group 2 member D*), der Liganden wie MICA/MICB und ULPB1-6 bindet^{41,42}. Ein weiterer aktivierender Rezeptor auf NK Zellen ist der Fc-Rezeptor FcγRIIIa (CD16), der von herausragender Bedeutung für die Wirkung monoklonaler Antikörper ist und auf den im Kapitel 1.5.2 genauer eingegangen wird⁴³.

1.2.2 Zytotoxizitätsmechanismen von NK Zellen

Aktiviert NK Zellen können ihre Zytotoxizität gegen als fremd oder entartet erkannte Zellen durch verschiedene Mechanismen entfalten. Eine Reaktion der aktivierten NK Zelle ist die Freisetzung der zytolytischen Substanzen Perforin (porenbildendes Protein) und Granzyme (Apoptose auslösende Serinproteasen)⁴⁴⁻⁴⁶. Man geht heute davon aus, dass die NK Zelle eine immunologische Synapse mit der Zielzelle formt und die zytotoxischen Moleküle in diese, durch die Fusion von sekretorischen Lysosomen mit der Zellmembran, freigesetzt werden⁴⁷⁻⁴⁹. Während der Degranulation wird das *Lysosomal-associated membrane protein-1* (LAMP-1 oder CD107a) transient auf der Oberfläche der NK Zelle präsentiert⁵⁰. Der zweite Mechanismus, durch den NK Zellen gegen Zielzellen wirken, ist durch Todesliganden induzierte Apoptose. Bekannte Liganden dafür sind Fas Ligand (FasL) und TNF-related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL), die korrespondierende Todesrezeptoren auf Zielzellen binden^{40,51}. Neuere Studien zeigen, dass NK Zellen auch durch die Freisetzung

von Exosomen, welche FasL- und Perforin-Moleküle enthalten, zytotoxisch gegen Tumorzellen wirken können. Die Exosomen enthalten typische NK Zell Marker wie CD56 und NKG2D-Rezeptoren und können nach Kontakt zu Tumorzellen auch NK Zellen selbst weiter aktivieren⁵².

Neben der direkten Zytotoxizität können NK Zellen durch die Sekretion von Zytokinen wie INF- γ , TNF und Interleukin (IL)-10 indirekt mit dem angeboren und adaptiven Immunsystem interagieren^{40,53}.

1.3 Tumorimmunologie

Den Grundstein der Tumorimmunologie legte Paul Ehrlich zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Am Ende seiner damaligen Ausführungen äußerte er die Hypothese, dass „*aberrante Keime [...] häufig vorkommen, aber [...] bei der überwiegenden Mehrzahl der Menschen vollkommen latent bleiben, dank der Schutzvorrichtung des Organismus*“⁵⁴. Wie sich zeigte benötigte es jedoch weitere 50 Jahre, bis erste experimentelle Untersuchungen seine Hypothese stützten. Dabei konnte gezeigt werden, dass syngene Krebszellen in Mäusen nach sequenzieller Transplantation nicht mehr anwachsen und somit eine bis dato unbekannte Immunisierung stattgefunden haben musste. Histologische Untersuchungen der getesteten Mäuse fanden damals tumorspezifische zytotoxische T-Zellen im Tumorgewebe^{2,55,56}. Das formale Konzept der „Immunüberwachung“ (*immune surveillance*) wurde schließlich 1967 von Frank Burnet formuliert. Dieses besagt, dass das Immunsystem kontinuierlich mutierte Zellen erkennt und eliminiert^{57,58}.

Die Tatsache, dass es offensichtlich trotz Immunüberwachung zu klinisch apparenten Tumoren kommt und experimentelle Studien in den folgenden Jahren sogar eine in Teilen Tumor-fördernde Wirkung des Immunsystems zeigten, erforderte zu Beginn des 21. Jahrhunderts jedoch eine Weiterentwicklung von Burnet's Theorie⁵⁸. Das in den folgenden Jahren entwickelte neue Konzept bekam den Begriff *Cancer immunediting* und teilte die Tumorentwicklung in drei Phasen ein. Phase I (Elimination) ist nahezu äquivalent mit dem Konzept der Immunüberwachung, mit der Ausnahme, dass ein kleiner Teil an Tumorzellen der Eliminierung entgeht. In Phase II, dem dynamischen Äquilibrium, kommt es zur

anhaltenden Auseinandersetzung zwischen dem Immunsystem und den Tumorzellen. Durch andauernde Mutation und Selektion der Tumorzellen ist es möglich, dass ein kleiner Teil immer wieder dem Immunsystem entkommt und gleichzeitig resistenter wird. Diese Phase wird auch *Tumor dormancy* genannt und kann Jahre anhalten. Am Ende des Selektionsprozesses beginnt Phase III (*immune escape*). Einzelne Tumorzellklone haben nun Mechanismen entwickelt, sich komplett der Immunüberwachung zu entziehen. Ab diesem Zeitpunkt ist es möglich, dass ein klinisch apparenter Tumor entsteht^{4,58-60}. Die Bedeutung dieses Konzepts zeigt sich auch daran, dass die Immunevasion 2011 von Hanahan und Weinberg als „Hallmark of Cancer“ eingeführt wurde⁶¹.

Zahlreiche *immune escape* Mechanismen wurden seither in der Literatur beschrieben: Ein Mechanismus ist der Verlust von MHC-Klasse I Molekülen, der in verschiedenen humanen Tumorentitäten beobachtet werden konnte und der die von zytotoxischen T-Zellen ausgelöste Immunantwort beeinflusst^{3,62-64}. Ein weiterer Mechanismus ist die Etablierung eines immunsuppressiven Mikroenvironments. Dazu gehört die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), welche immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β produzieren und immunsuppressive, costimulatorische Moleküle exprimieren wie PD-L1 (*programmed death-ligand 1*)⁶⁰. Das letztgenannte wird auch als Checkpoint Molekül bezeichnet und kann auch von Tumorzellen selbst exprimiert werden. Es ist einer der Angriffspunkte der erfolgreich klinisch eingesetzten Checkpoint-Inhibitoren (CPI)⁶⁵.

1.4 Immuntherapie

Das zunehmende Wissen über die enge Verbindung zwischen Onkologie, Infektiologie und Immunologie hat zu zahlreichen therapeutischen Ansätzen geführt, welche unter dem Begriff der Immuntherapie zusammengefasst sind. Im weitesten Sinne sind darunter alle Therapien zu verstehen, welche durch Modulation des Immunsystems Erkrankungen wie Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionen, entgegenwirken. Im Laufe der Zeit hat sich das Spektrum der Immuntherapie in der Onkologie enorm erweitert. Der

folgende Abschnitt fasst daher die relevantesten Entwicklungen zusammen. Einer der ersten immuntherapeutischen Ansätze war die Nutzung von Zytokinen. Mit der Entdeckung von Interferon-alpha (INF- α) 1957 und später weiteren Zytokinen wie IL-2, INF- γ und TNF hatte man Wirkstoffe gefunden, welche u. a. die zytotoxische Aktivität von Immunzellen gegen Tumorzellen verstärkten⁶⁶⁻⁶⁸. Ende des 20. Jahrhunderts wurden IL-2, INF- α und weitere rekombinante Zytokine klinisch getestet und in Teilen zur Therapie zugelassen. Die niedrige Ansprechrate und hohe Toxizität von hoch dosierten IL-2 und INF- α Gaben führte jedoch dazu, dass die therapeutische Relevanz und Einsetzbarkeit eher kritisch gesehen wurde^{2,68}. Dennoch wurde dieser Ansatz weiterverfolgt, wobei der Fokus heutzutage auf der Verwendung anderer Zytokine, wie z. B. IL-15 liegt. Zusätzlich werden Zytokine häufig mit weiteren Proteinen zu einem neuen, stabileren Konstrukt kombiniert. ALT-803 ist z. B. ein rekombinantes Protein aus IL-15 fusioniert mit einer IgG1 Fc Domäne. Dieses zeigte gute Ergebnisse in klinischen Studien mit Leukämien, nicht kleinzelligem Lungenkarzinom und Blasenkarzinom^{68,69}.

Aktive Vakzinierung ist eine weitere immuntherapeutische Strategie. Die meisten Tumorstoffe zielen heute darauf ab, mit optimal ausgewählten Tumorantigenen eine effektive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Immunantwort zu induzieren. Hierfür ist es notwendig, Peptidfragmente über MHC Moleküle zu präsentieren. Dafür gibt es drei Typen an genutzten Plattformen für Vakzine:^{70,71}

- 1) zelluläre Vakzine (z. B. ex vivo mit Tumorantigen beladene DZs)
- 2) Virusvektoren
- 3) molekulare Vakzine in Form von Peptiden, DNA oder RNA

Während Viren intrinsische zelluläre Eintrittsmechanismen besitzen, werden Peptide von APCs sowie Nukleinsäuren von normalen Körperzellen aufgenommen. Letztgenannte werden zu den Tumorproteinen translatiert, die wie normale zelluläre Proteine auf MHC I präsentiert werden⁷². Trotz erster Erfolge hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Entwicklung eines Tumorstoffes deutlich komplexer ist als man anfänglich dachte. Problematisch sind u. a. die geringe Immunogenität von Tumorantigenen, die hohe

Tumorzelllast etablierter Tumore, das immunsuppressive Mikroenvironment und, speziell bei Peptidvakzinierung, die Diversität an MHC-Haplotypen. Dem versucht man zu begegnen, indem man gegen multiple Tumorantigene immunisiert, personalisierte Strategien gegen individuelle Tumorneoantigene entwickelt, Vakzinvektoren und Adjuvanzen optimiert und Kombinationstherapien mit Immunstimulanzien wie CPI testet. Aktuell gibt es zahlreiche klinische Studien, in denen Vakzinierungen gegen Tumore erprobt werden⁷²⁻⁷⁴.

Ein weiteres Gebiet der Immuntherapie ist die adoptive Zelltherapie, auch zelluläre Immuntherapie genannt. Die Grundidee dahinter ist, autologe T- oder NK Zellen eines Krebspatienten zu entnehmen, diese entweder nur zu vermehren und zu aktivieren oder zusätzlich genetisch zu verändern und sie danach dem Patienten als Tumorthherapie zu infundieren. Speziell die CAR- (*chimeric antigen receptor*) T-Zell Therapie hat sich in den letzten Jahren als wichtige neue Krebstherapie etabliert⁷⁵. CAR-T-Zellen sind autologe T-Zellen, welche ex vivo genetisch manipuliert werden, sodass sie die Antigen-Bindungsdomäne eines Antikörpers fusioniert mit der intrazellulären Domäne eines CD3-TCR (CD3-Zeta) exprimieren. Dadurch können sie unabhängig von der MHC-Erkennung aktiviert werden. Zusätzlich verbessern costimulatorische Domänen wie CD28, 4-1BB (CD137) oder Zytokine wie IL-12 als Modifikationen die Effektorfunktion. Im August 2018 wurden in Europa zwei CD19-spezifische CAR-T-Zell-Therapeutika für die Behandlung hämatologischer Tumore zugelassen⁷⁶⁻⁷⁸. Aktuell gibt es auch Studien mit CAR-T-Zellen, die z. B. gegen CEA (Carcinoembryonales Antigen) gerichtet sind und in der Behandlung des metastasierten KHK getestet werden⁷⁹⁻⁸¹.

Ein weiterer essenzieller Bereich in der Immuntherapie ist die Verwendung von therapeutischen monoklonalen Antikörpern, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird.

1.5 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline, Ig) sind Proteine, die in ihrer löslichen Form von Plasmazellen als Reaktion auf den Kontakt mit einem Fremdartigen gebildet werden. Ihre ursprüngliche Funktion im Immunsystem ist, neben der direkten Neutralisation, die Opsonisierung von Pathogenen. Dadurch werden diese „immunologisch sichtbar“ und verschiedene Immuneffektoren können zur Elimination rekrutiert werden¹. Basis jedes Antikörpers ist das Schlüssel-Schloss Prinzip, welches schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Paul Ehrlich postuliert wurde. Dieses Prinzip besagt, dass ein Antikörper Antigenbindungsstellen (Paratope) besitzt, die an eine spezifische Region (Epitop) eines Antigens binden können^{4,82}.

1.5.1 Struktur und Charakteristika von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine, deren exakter molekularer Aufbau im Jahr 1969 aufgeklärt wurde. Die Grundstruktur eines IgG1 Antikörpers besteht aus jeweils zwei identischen schweren (50 kDa) sowie leichten (25 kDa) Polypeptidketten. Die antikörpertypische Y-Form entsteht durch Disulfidbrücken, von denen jeweils eine zwischen schwerer und leichter Kette lokalisiert ist und zwei weiteren, welche die beiden schweren Ketten verbinden⁸³.

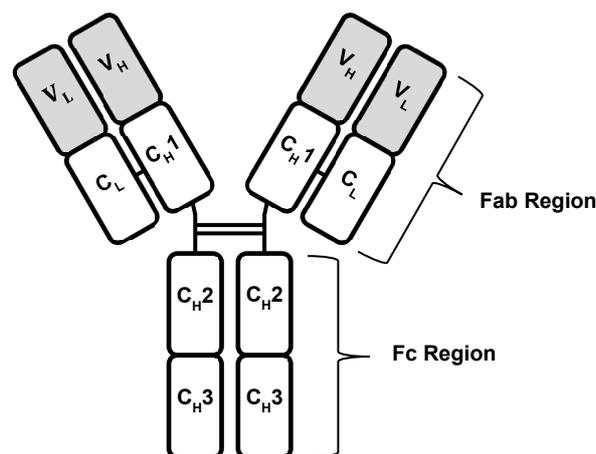


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines humanen IgG1 Antikörpers.

Weiß: konstante Regionen, Grau: variable Regionen, Fab: fragment antigen binding; Fc: fragment crystallizable; C: constant; V: variable; H: heavy; L: light. Abgewandelt aus⁸⁴.

Eine N-terminale variable Domäne (V_H) sowie drei konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) bilden die schwere Kette eines Antikörpers des Typs IgG. Eine N-terminale variable Domäne (V_L) sowie eine konstante Domäne (C_L) bilden die leichte Kette^{2,85}. Zwischen den C_{H1} und C_{H2} Domänen (flexible Hinge-Region) befindet sich außerdem die Spaltungsstelle des proteolytischen Enzyms Papain. Dieses kann einen Antikörper in zwei identische Fab (*fragment antigen binding*) Fragmente sowie ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) spalten. Das Fc-Fragment beinhaltet Bindungsstellen für Moleküle, hierunter z. B. Fc-Rezeptoren. Innerhalb der variablen Regionen gibt es drei hypervariable Bereiche (CDR1-3, *complementary determining regions*), welche die Spezifität eines Antikörpers determinieren. Weitere, die CDR umgebende Gerüstregionen (*FR, framework regions*) charakterisieren die räumliche Struktur der Antigenbindungsstelle^{1,2}. Durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente (V_H : V,D,J; V_L : V,J), de novo Synthese von Sequenzabschnitten an den Verknüpfungsstellen und der Kombination von V_H und V_L kann das Immunsystem eine geschätzte Anzahl von ca. 10^{11} verschiedener Antigenbindungsstellen erzeugen^{2,14}. Diese Variabilität wird durch zusätzliche Hypermutationen während der B-Zell Reifung noch erweitert^{86,87}. Außerdem zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass diverse weitere unkonventionelle Strategien, wie z. B. die Insertion von Sequenzen aus Genen, die nicht an der Bildung von Immunoglobulin beteiligt sind, die Diversität von Antikörpern noch zusätzlich erhöhen⁸⁸.

Man kennt fünf verschiedene Typen der schweren Kette (γ , δ , α , μ und ϵ). Darauf basierend ergeben sich fünf Isotypen von Antikörpern (IgG, IgD, IgA, IgM und IgE), welche sich in Struktur und Antigenaffinität unterscheiden. Auch die Verteilung im Körper ist nicht homogen. Im Blut befinden sich vorwiegend IgM und IgG. Die meisten Anti-Tumor-Antikörper sind vom Typus IgG und hier insbesondere aus der Subklasse IgG1, da diese u. a. die längste Serumhalbwertszeit aufweisen und am effektivsten die im nächsten Kapitel vorgestellten Wirkmechanismen auslösen^{2,89-92}.

1.5.2 Antikörpertherapie

1975 wurde durch die Entwicklung der Hybridomtechnologie durch Köhler und Milstein der Grundstein für Verwendung therapeutischer Antikörper gelegt. Zum ersten Mal konnten damit monoklonale Antikörper gegen definierte Antigene hergestellt werden. Hierbei wurden B-Zellen von mit dem gewünschten Antigen immunisierten Mäusen entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Dadurch entstanden kultivierbare Hybride, die murine Antikörper der gewählten B-Zelle produzierten⁹³. Aufgrund des murinen Ursprungs hatten diese jedoch Effektivitäts- und Toxizitätsprobleme⁹⁴. Mitte der 1980'er Jahre wurde es durch rekombinante DNA-Technologie möglich, den murinen Fc-Teil durch einen humanen Fc-Teil zu ersetzen und Antikörper damit zu chimärisieren⁹⁵. Etwas später konnten die CDRs eines murinen Antikörpers auch extrahiert werden und in ein humanes Antikörpergerüst eingebaut werden. Dadurch entstanden humanisierte Antikörper wie z. B. Alemtuzumab (CD56, Lemtrada®)⁹⁶. Seit Mitte der 1990'er Jahre ist es nun auch möglich, durch transgene Maustechnologien und Phage-Display komplett humane Antikörper herzustellen^{97,98}. 1997 folgte die Zulassung des anti-CD20 Antikörpers Rituximab (MabThera®) als erster Antitumor-Antikörper zur Therapie von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen⁹⁹.

1.5.2.1 Wirkmechanismen therapeutischer IgG-Antikörper

Antikörper haben direkte und indirekte Wirkmechanismen. Direkte Wirkungen beruhen auf der Bindung des Antikörpers an das entsprechende Antigen, bei indirekten Mechanismen werden zusätzlich Immuneffektoren über den Fc-Teil involviert¹⁰⁰.

Zu den direkten Wirkmechanismen von IgG Antikörpern zählt man agonistische und blockierende (antagonistische) Wirkungen auf Rezeptoren und Enzym neutralisierende Wirkungen¹⁰⁰. Cetuximab ist z. B. ein Antikörper, der den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) blockiert und dadurch Wachstumssignale blockiert, welche das Tumorwachstum fördern¹⁰¹.

Indirekte Wirkmechanismen werden in zellabhängige und zellunabhängige Mechanismen kategorisiert. Zelluläre Mechanismen von IgG Antikörpern werden durch die Bindung des Fc-Teils an eine Familie von Fc-Rezeptoren (FcγR) auf

Effektorzellen ausgelöst. Im Menschen unterscheidet man hier zwischen FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) mit den Isoformen FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc und FcγRIII (CD16) mit den Isoformen FcγRIIIa und FcγRIIIb¹⁰². Diese FcγR sind auf einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert und unterscheiden sich in Struktur, Funktion und Affinität zu IgG. Während die meisten FcγR aktivierende Funktionen haben (FcγRI, FcγRIIa/c und FcγRIIIa), gibt es auch inhibitorische Fc-Rezeptoren (FcγRIIb)¹⁰². Der aktivierende FcγRIIIa ist, neben anderen Fc-Rezeptoren, ein entscheidender Mediator der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC)¹⁰³⁻¹⁰⁶. Da NK Zellen als einzige Zellen fast nur FcγRIIIa exprimieren, gelten sie als die relevantesten Zellen dieses Mechanismus². ADCC ist allgemein definiert eine durch Antikörper vermittelte zelluläre Immunreaktion, bei der Effektorzellen Zielzellen eliminieren, die einen spezifischen Antikörper an der Zelloberfläche gebunden haben. Bezüglich des molekularen Prozesses von ADCC ist bekannt, dass FcγRIIIa in NK Zellen mit zellmembranständigen „*common*“ FcR γ-Ketten und CD3-ζ Ketten assoziiert sind und diese in ihrem zytoplasmatischen Teil *immune tyrosine-based activating* motifs (ITAM) tragen. Nach Bindung eines Immunkomplexes (antigenbindender Antikörper) an FcγR werden diese ITAMs phosphoryliert, was eine Signalinduktion in die NK Zelle auslöst^{103,107,108}. Diese Signalinduktion wird nur erzeugt, wenn mehrere FcγR durch Immunkomplexe in einer multivalenten Form quervernetzt (*cross-linking*) werden. Eine einzelne Bindung eines nicht antigengebunden Antikörpers ist nicht ausreichend für eine Signalinduktion¹⁰⁸⁻¹¹¹. Nach der NK Zell Aktivierung wird die Ausschüttung von Perforin und Granzymen ausgelöst, woraufhin eine Lyse der Zielzellen erfolgt^{2,107-109}. In Mäusen wird ADCC vor allem von Monozyten und Makrophagen vermittelt, und es gibt Hinweise, dass auch einzelne humane Populationen von Monozyten dazu befähigt sind¹¹². Wie bereits erwähnt sind im Menschen die NK Zellen die wesentliche Zellpopulation, welche ADCC vermittelt². Gesichert ist zudem, dass Makrophagen eine Antikörper-vermittelte Phagozytose (*antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) auslösen können. Darunter versteht man die Phagozytose einer Zielzelle nach Opsonierung. Dies ist ein weiterer zellulärer, indirekter Wirkmechanismus von IgG Antikörpern¹¹³.

Neben den zellabhängigen Prozessen ist außerdem die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) von hoher Relevanz. Durch Anlagerung des Komplementfaktors C1q an Fc-Teile von mindestens zwei antigenbindenden IgG-Molekülen wird die klassische Komplementkaskade ausgelöst^{100,114}.

1.5.2.2 Fc-optimierte IgG Antikörper

Trotz beachtlicher Erfolge von Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Zielstrukturen (Antitumor-Antikörper) in der Krebstherapie ist die therapeutische Effektivität oftmals nicht optimal. Faktoren wie die Mutation von Rezeptoren, alternative Signalwege, genetische Variabilität und die Herunterregulation von Antigenen schränken die Wirksamkeit von Antikörpern ein¹¹⁵. Molekulare Techniken, welche die Pharmakokinetik, die Effektorfunktion, die Größe und Immunogenität von Antikörpern verändern sind deshalb Schlüsselemente in der Entwicklung optimierter antikörperbasierter Therapien^{100,116}.

Die Fc-Optimierung ist eine vielversprechende Möglichkeit, um die Wirkung therapeutischer Antikörper zu verbessern. Zwei Strategien der Modifikationen des Fc-Teils zur ADCC Steigerung werden heute unterschieden: die Änderung der Glykosylierung sowie die Änderung der Aminosäuresequenz eines Antikörpers^{2,117,118}.

Seit 1993 ist bekannt, dass die Glykosylierung des Fc-Teils essentiell für die biologischen Aktivität eines Antikörpers ist¹¹⁹. 2002 konnte man zeigen, dass durch den Verlust einer Fucose im Zuckeranteil des Fc-Teils die Affinität eines IgG1 Antikörpers zum humanen FcγRIIIA um das zehnfache bis fünfzigfache gesteigert werden kann^{2,120}. Heute ist das *Glyko-Engineering* von Antikörpern eines der zentralen Werkzeuge, mit denen man die therapeutische Wirksamkeit steigern kann. Obinutuzumab (Gazyvaro®), ein Fucose-optimierter CD20 Antikörper, ist seit 2014 für die Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie zugelassen². RO5083945 (EGFR, NCT01326000), ein Antikörper mit veränderter Fc-Glykosylierung, befindet sich in einer Phase II Studie für das metastasierte KHK¹²¹⁻¹²³.

Die Änderung der Aminosäuresequenz des Fc-Teils ist eine zweite Strategie der Fc-Optimierung. 2006 konnte die Firma Xencor durch den Austausch von Aminosäuren in den C_H2-Domänen die Affinität von Fc-Teilen zu FcγR erheblich erhöhen^{2,102,124}. In Testungen mit bekannten Antikörpern, wie z. B. Rituximab, deren Fc-Teil durch mutierte Aminosäuren verändert wurden, zeigte sich, dass die Kombination der Mutationen S239D/I332E (SDIE-Modifikation) die ADCC deutlich steigert¹⁰². Nachfolgende weitere in vitro Studien zeigten, dass SDIE-modifizierte Antikörper eine bis zu 100-fach erhöhte Potenz für ADCC und ADCP haben. Darüber hinaus gibt es auch mehrere in vivo Studien, die eine gesteigerte Wirksamkeit eines SDIE modifizierten Antikörpers zeigen^{2,102,118,125}. 2020 wurde der SDIE-modifizierte CD19 Antikörper Tafasitamab von der FDA (*Food and Drug Administration*) für die Therapie von r/r DLBCL zugelassen^{126,127}. Neben S239D/I332E gibt es noch eine Vielzahl weiterer Aminosäuren, deren Austausch die Funktion des Fc-Teils verbessern¹²⁸.

1.6 Kolorektales Karzinom

Laut der GLOBOCAN-Datenbank der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist das kolorektale Karzinom (KRK) weltweit mit 1,8 Millionen Neuerkrankungen und fast 861.000 Todesfällen im Jahr 2018 der dritthäufigste Krebs bei Männern und der zweithäufigste bei Frauen^{129,130}. In den letzten Jahren sind die Gesamtinzidenz und Gesamtmortalität leicht rückläufig, was vor allem auf das Etablieren von Screeningmethoden wie die Koloskopie zurückzuführen ist. Allerdings steigt die Inzidenz des KRK bei Patienten unter 50 jährlich um 2% an^{131,132}. Die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines KRK sind erbliche Veranlagung, persönliche oder familiäre Vorbelastung, chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie abdominelle Bestrahlung. Neben diesen gibt es Umwelt- und Lifestylefaktoren, wie z. B. Alter, Übergewicht, Diabetes mellitus, Tabakkonsum, Alkoholkonsum, übermäßige Ernährung mit prozessiertem Fleisch und fehlende körperliche Aktivität, welche zumindest in Beobachtungsstudien als Risikofaktoren identifiziert wurden¹²⁹.

In der Pathogenese des KRK geht man von einer Ursprungszelle aus, die Stammzeleigenschaften besitzt und maßgeblich ist für die Initiation und

Aufrechterhaltung des Tumors bzw. Bildung von Metastasen. Die Ursprungszelle ist das Resultat aus akkumulierten genetischen und epigenetischen Veränderungen und sitzt in den Krypten der kolorektalen Mukosa. Aus ihr entwickeln sich in über 10 - 15 Jahren zuerst Vorläuferläsionen wie Polypen und später apparente KRK¹³³⁻¹³⁵. Typische Frühsymptome fehlen meist; auffällig können Änderungen der Stuhlgewohnheiten, rektale Blutungen, abdominelle Schmerzen/Krämpfe und Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust und Anämien sein¹³⁶.

Die Klassifikation des KRK erfolgt auf Grundlage der TNM Kriterien. Diese beinhalten die lokale Tumorausbreitung (T), die Anzahl befallener Lymphknoten (N) sowie Art und Ausmaß der Metastasierung (M). Damit kann das KRK in ein Tumorstadium zwischen 0-IV nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) eingeteilt werden. In Kombination mit molekularen Markern und der allgemeinen Verfassung eines Patienten können daraus die Prognose und die Therapie abgeleitet werden¹³⁷.

Die Spanne des mittleren 5 Jahres-Überlebens des KRK beträgt zwischen ca. 90% (Stadium I) bis ca. 14% (Stadium IV). 20 - 25% der Patienten werden erst im Stadium IV (Metastasierung) diagnostiziert¹³². Dies verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Therapieoptionen.

1.6.1 Aktuelle Therapie

In den Stadien I-III (lokale/regionale Befunde) stehen operativen Methoden an erster Stelle. Diese werden begleitet von einer möglichen neo-/ adjuvanten Chemotherapie (Fluorouracil, Capecitabine, Oxaliplatin oder Irinotecan) oder Radiotherapie¹³⁸. Im Stadium IV (Metastasierung) gibt es neben den bereits genannten Optionen Antikörper basierte Therapiemöglichkeiten. Bevacizumab (Avastin®) ist ein antiangiogenetischer Antikörper, der an VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) bindet und die Interaktion mit dem korrespondierenden Rezeptor verhindert. Damit wird die für Tumore wichtige Angiogenese gehemmt. Ramucirumab (Cyramza®) hat einen ähnlichen Wirkmechanismus und bindet an den VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor receptor 2)^{84,139-141}. Studien zeigen, dass die Wirksamkeit einer

antiangiogenetischen Therapie auf wenige Monate beschränkt ist, da danach Resistenzmechanismen wie die Hochregulation von VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) die Effizienz einschränken¹⁴². Fest in die Therapie integriert sind gegenwärtig auch die beiden gegen den EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) und Panitumumab (Vectibix[®]). Panitumumab ist eine Weiterentwicklung des chimären, monoklonalen Antikörpers Cetuximab und wurde mittels einer Xeno-Mouse Technologie als komplett humaner Antikörper entwickelt^{143,144}. Nachteil der gegen den EGFR gerichteten Antikörper ist, dass ein RAS (*Rat sarcoma*) Wildtyp vorliegen muss, also keine Mutation in den RAS-Genen (*KRAS* Exon 2-4 und *NRAS* Exon 2-4) vorliegen darf^{145,146}. Nur ca. 44% der Patienten mit metastasierten KRK sind RAS WT^{84,147}. Auch die gegen den EGFR gerichteten Antikörper entwickeln Resistenzen, was u. a. auf einen kleinen Anteil an *KRAS* mutierten Zellen in den meisten KRK zurückzuführen ist, die sich dadurch der Therapie entziehen und Ausgangspunkt eines erneuten Wachstums sind¹⁴⁸. Neueste Studien haben außerdem ergeben, dass bei einem rechtsseitigen Sitz im Kolon kein Nutzen eines zusätzlich verwendeten EGFR-Antikörpers gegenüber der klassischen Chemotherapie oder einer Kombinationstherapie mit Bevacizumab besteht^{133,149}. Die CPI Nivolumab (Opdivo[®]), Ipilimumab (Yervoy[®]) und Pembrolizumab (Keytruda[®]) sind von der FDA für die Therapie von MSI (Mikrosatelliten-instabil) KRK zugelassen¹⁵⁰. Unter den Patienten mit metastasierten KRK sind jedoch nur etwa 5% MSI^{84,151}. Neben den Antikörperbasierten Therapien werden auch Kinaseinhibitoren wie z. B. Regorafenib (Multikinase-Inhibitor, Stivarga[®]) und Encorafenib (BRAF-Inhibitor, Braftovi[®]) in der Therapie des KRK verwendet^{152,153}. Nichtsdestotrotz, die Limitationen der bisherigen Therapiemöglichkeiten verdeutlichen die Wichtigkeit der Entwicklung neuer Ansätze, um die Therapie von KRK zu verbessern.

1.7 Akute lymphatische B-Zell Leukämie (B-ALL)

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die durch Proliferation und Akkumulation maligner entarteter, unreifer lymphatischer Zellen im KM, PB und weiteren lymphatischen sowie nicht

lymphatischen Geweben gekennzeichnet ist. Per Definition spricht man bei einem Blastenanteil von über 25% im KM von einer ALL, ansonsten wird die Erkrankung als lymphoblastisches Lymphom klassifiziert^{154,155}.

Die Inzidenz der ALL wird auf ca. 1,6/100.000 pro Jahr geschätzt. Ca. 60% der Diagnosen werden vor dem 20. Lebensjahr gestellt. Bei den über 70-Jährigen gibt es einen zweiten, kleineren Häufigkeitsgipfel^{154,156}. Während die meisten ALL in Gesunden ohne prädisponierende Faktoren auftreten, konnten für einen kleinen Teil Risikofaktoren definiert werden. Darunter sind angeborene genetische Faktoren (z.B. das Down-Syndrom), Infektionen und die Exposition zu ionisierender Strahlung oder Pestiziden¹⁵⁴.

Die klinische Symptomatik entwickelt sich in der Regel innerhalb von Tagen und ist oftmals geprägt von der Verdrängung des normalen blutbildenden KM und der Infiltration weiterer Organe. Dies kann zu Fieber, Fatigue, Verwirrtheit, Palpitationen, Dyspnoe, Blutungsneigung, Lymphadenopathien, Knochenschmerzen, Hepato-/Splenomegalien und bei ZNS (Zentrales Nervensystem) Beteiligung zu neurologischen Symptomen führen. Typische Laborveränderungen sind Leukozytose, Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, wobei diese auch fehlen können¹⁵⁷.

Die WHO Klassifikation von 2016 listet die ALL als B/T-lymphoblastische Leukämie/Lymphom und unterklassifiziert zusätzlich einzelne Gruppen auf Basis von aktuell 9 spezifischen rekurrenten genetischen Anomalien¹⁵⁵. Darunter zählt u.a. die t (Translokation) (9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL (BCR: *breakpoint cluster region*; ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) und die t(v (variabel);11q23.3); KMT2A rearrangiert (früher MLL (*Mixed lineage leukemia*) rearrangiert). Unter der zuletzt genannten ist mit einem Anteil von ca. 5 - 10% aller ALL-Patienten die t(4;11)(q21;q23), KMT2A-MLLT2 bzw. MLL-AF4. MLL-AF4 ist der zum Stand dieser Arbeit in der internationalen Literatur häufiger verwendete Begriff und deshalb im Folgenden verwendet^{155,158-161}. MLL rearrangierte ALL gehen mit einer ungünstigen Prognose einher¹⁶². Die Bedeutung von MLL-AF4 für diese Arbeit wird in Kapitel 1.8.2 erläutert. In der klinischen Praxis in Deutschland werden zur Klassifikation die Kriterien der GMALL-Studien (German-Multicenter-ALL) verwendet. Diese teilt die ALL auf

Basis einer Immunphänotypisierung der Blasten und genetischen Charakteristika ein. Eine Subgruppe ist die B-Linien-ALL (ca. 75%), die in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades noch in Pro-B-ALL, common-ALL, Prä-B-ALL und reifzellige B-ALL unterteilt wird ^{163,164}.

Während die pädiatrische ALL inzwischen Langzeitüberlebensraten von ~90% aufweist, beträgt die Heilungsrate der adulten ALL lediglich 30% - 40% ^{161,164,165}. Dies verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Therapieoptionen.

1.7.1 Aktuelle Therapie der B-ALL

Die Therapie der ALL bei adulten Patienten erfolgt in der Regel an hämatologischen Zentren, in Abhängigkeit von Einschlusskriterien (u.a. des Alters) in Therapiestudien (z.B. GMALL). Diese beinhalten u.a. standardisierte Phasen von Chemotherapiezyklen: Induktion, Konsolidation und Erhaltung ¹⁵⁴. Hierbei eingesetzte Medikamente sind u.a. Cyclophosphamid, Dexamethason, Vincristin, Dauno-/Doxorubicin, L-Asparaginase, Cytosin-Arabinosid und Methotrexat ^{154,164}. In Abhängigkeit von Risikomerkmalen kann eine Stammzelltransplantation folgen. Hervorzuheben ist die Therapie von BCR-ABL⁺ B-ALL-Patienten (15 - 25% der adulten B-ALL), die seit Entwicklung und Einsatz von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) wie Imatinib, Dasatinib und Ponatinib ein verbessertes Langzeitüberleben haben ^{159,161,166}. Zudem sind neuerdings verschiedene Immuntherapeutika für die Therapie zugelassen. Blinatumomab, ein bispezifischer CD19xCD3-Antikörper, wird u.a. für die Therapie CD19⁺ rezidivierender/refraktärer (r/r) B-ALL angewendet ^{161,167}. Inotuzumab Ozogamicin, ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat des zytotoxischen Antibiotikums Ozagamicin mit einem CD22 Antikörper wird u.a. in der Therapie CD22⁺ r/r B-ALL angewendet ^{161,168,169}. 2019 wurde Tisagenlecleucel, ein anti-CD19 CAR-T-Zelltherapeutikum für die Therapie r/r B-ALL-Patienten bis einschließlich 25 Jahre zugelassen ^{161,170}. Da ca. 30 - 50% der B-ALL-Patienten auch CD20⁺ sind, wird aktuell auch Rituximab oft als ergänzendes Erstlinienmedikament eingesetzt ^{161,171}. Die genannten Immuntherapeutika haben die Therapie von r/r B-ALL deutlich verbessert und aktuell gibt es zahlreiche klinische Studien, die eine Erstlinienanwendung sowie eine Erweiterung der Indikationen testen ¹⁵⁴.

Nichtsdestotrotz gibt es bei diesen, wie bei allen Antigen-abhängigen Immuntherapeutika, die Problematik der Antigenmodulation, die Resistenzen auslösen kann und für die bereits genannten zugelassen Immuntherapeutika nachgewiesen wurde^{154,161,168,172,173}. Dies kann u.a. durch die Verwendung mehrerer therapeutischer Antigene vermieden werden und verdeutlicht die Wichtigkeit, neue Antigene zur Behandlung der B-ALL zu identifizieren¹⁵⁴.

1.8 CD133

CD133, auch bekannt als Prominin-1, ist ein pentameres, transmembranäres Glykoprotein. Ursprünglich wurde CD133 auf murinen neuroepithelialen Stammzellen sowie kurze Zeit später auf humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben^{174,175}. Heute ist bekannt, dass CD133 in Mikrovilli und Membranprotrusionen der apikalen Plasmamembran diverser menschlicher Epithelien vorkommt und in Teilen als Stammzellmarker für physiologische Zellen fungiert. Des Weiteren wird CD133 auf Leukämien und soliden Tumoren, darunter Kolorektal-, Mamma-, Lungen-, Pankreas-, Magen-, ovarielle und hepatozelluläre Karzinome sowie im Melanom und in Hirntumoren exprimiert^{176,177}. Zusätzlich wurde CD133 als Tumorstammzellmarker in diversen Tumorentitäten beschrieben¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

CD133 wird vom PROM1 Gen auf Chromosom 4 (4p15.32) codiert. Strukturell besteht CD133 aus 850 - 860 Aminosäuren. Diese bilden fünf Transmembrandomänen sowie zwei große extrazelluläre Schleifen und zwei kleine intrazelluläre Schleifen. Das Ende bildet eine extrazelluläre N-terminale Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne^{176,180,181}. Durch insgesamt neun Glykosylierungsstellen erweitert sich das Molekulargewicht auf ca. 120 kDa.

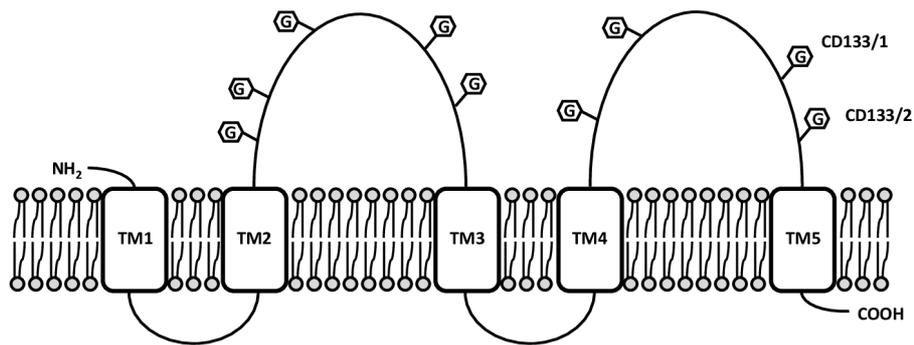


Abbildung 2: Schematische Abbildung der CD133 Struktur.

TM: Transmembrandomäne, G: Glykosylierung. Grafik entstanden mit Vorlage aus ¹⁸¹.

CD133 besitzt mehrere Epitope, an denen Antikörper binden können. Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen sind CD133/1, an welches die Antikörperklone AC133 und W6B3C1 binden, sowie CD133/2, woran die Antikörperklone 293C3 und AC141 binden. Sowohl CD133/1 als auch CD133/2 befinden sich an Glykosylierungsstellen einer großen extrazellulären Schleife ^{181,182}. Weiterhin ist bekannt, dass CD133 von 5 unterschiedlichen Promotoren reguliert wird und es im Menschen 7 verschiedene Splicevarianten gibt. Dies deutet auf unterschiedliche gewebeabhängige, physiologische Rollen von CD133 hin, die jedoch bis heute nicht exakt aufgeklärt sind ^{176,177,183,184}. Einzig die Bindung von CD133 an membranständiges Cholesterin, die Assoziation mit in Signalkaskaden involvierten *Lipid Rafts* und damit eine Rolle bei der Organisation der Plasmamembran scheint relativ gesichert ¹⁸¹.

Neben der physiologischen Rolle von CD133 ist auch die Krebs-assoziierte Funktion noch weitgehend unklar. CD133 kann über eine direkte Interaktion in verschiedene, tumorrelevante Signalwege eingreifen. Unter anderem hat man festgestellt, dass CD133-überexprimierende Pankreaskarzinomzellen eine erhöhte Proliferation, Tumorgenese und Migrationsfähigkeit zeigen und dies auf eine direkte Interaktion von CD133 mit dem EGFR zurückgeführt werden kann ^{179,181,185}. Zusätzlich wurde eine Beteiligung einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des EGFR in Interaktion mit CD133 als ein Resistenzmechanismus gegen am EGFR Signalweg angreifenden Medikamenten vermutet ^{179,186}. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von CD133 an Chemotherapieresistenz,

Metastasierung, Autophagie, dem Lipidmetabolismus und einer erhöhten Resistenz gegen ROS (*Reactive Oxygen Species*) beschrieben¹⁷⁹.

1.8.1 Rolle von CD133 in KRK

Mehrere aktuelle Studien/Metaanalysen zeigen, dass CD133 speziell in KRK häufig exprimiert ist und dort als unabhängiger, negativer prognostischer Marker fungiert^{84,187-189}. Eine Metaanalyse von über 2000 KRK Patienten, bei denen die CD133 Expression immunhistochemisch bestimmt wurde, ergab außerdem eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern. So ist CD133 mit einem höheren T und N Status, vermehrt positiven Lymphknoten und vermehrter vaskulärer Infiltration korreliert¹⁸⁸. In der Literatur finden sich außerdem Hinweise, dass CD133 in KRK an Resistenzen gegen Chemotherapien beteiligt ist¹⁹⁰.

CD133 ist außerdem ein häufig beschriebener, jedoch kontrovers diskutierter Stammzellmarker im KRK. Während zahlreiche Studien eine Tumor-initiiierende Wirkung in CD133⁺-Zellen zeigten, konnte Shmelkov et al. 2008 in einer viel beachteten Studie keinen Unterschied in der in vivo Tumorbildung zwischen CD133^{+/-} Zellen finden¹⁹¹⁻¹⁹³. In einer 2019 erschienenen Metaanalyse, die alle zu diesem Thema verfügbaren Ergebnisse zusammenfasst, wird betont, dass es Unterschiede zwischen Tumorzelllinien, Primärzellen und metastasierten Primärzellen zu geben scheint. Letztlich kommt die Metanalyse zu dem Ergebnis, dass eine Kombination aus den Markern CD44⁺/CD133⁺ als Stammzellmarker für das KRK geeignet ist¹⁹⁴.

1.8.2 Rolle von CD133 in der B-ALL

Mehrere Studien zeigen, dass CD133 neben der Expression auf akuten myeloischen Leukämie (AML)-Zellen auch ein häufig (ca. 30 - 40%) exprimiertes Antigen auf B-ALL-Zellen ist^{195,196}. Während in zahlreichen Studien keine statistisch signifikante Assoziation von CD133⁺ mit dem Alter, dem Geschlecht und klinischen Charakteristika wie die Anzahl leukämischer Zellen in PB und KM bei ALL-Patienten gefunden wurde, konnte eine Assoziation mit Vorliegen vermehrt unreifer Zellen gezeigt werden^{161,195,197}. Zusätzlich ist die CD133 Expression in der ALL signifikant mit einer höheren Chemotherapieresistenz

korreliert und es besteht einen Trend zu niedrigeren Raten an CR (*complete remission*) und einer höheren Inzidenz an Rezidiven und Todesfällen^{161,195,198,199}. Außerdem beschrieben ist die sehr häufige Expression von CD133 auf MLL-AF4 B-ALL^{161,196,200}. Dies geht auf die genetische Modulation von PROM1 durch MLL-AF4 zurück^{158,161}. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Expression von CD133 ein entscheidender Faktor für das Überleben von MLL-AF4 rearrangierten Leukämiezellen ist^{158,161,200}. 2018 wurden bereits CD19xCD133 tan (tandem) CAR-T-Zellen erfolgreich gegen MLL rearrangierte Leukämiezellen getestet²⁰¹. Die Existenz und Rolle von Tumorstammzellen in der ALL ist, im Gegensatz zur AML, deutlich kontroverser diskutiert, und die mögliche Bedeutung von CD133 hierin ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt^{181,202,203}.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung und Etablierung eines Fc-optimierten CD133 Antikörpers in der Therapie des KRK und der B-ALL. In Vorarbeiten konnte bereits der Fc-optimierte CD133 Antikörper 293C3-SDIE präklinisch in der AML charakterisiert werden²⁰⁴. Im Kontext der schlechten Überlebenschancen von KRK-Patienten im metastasierten Stadium IV und der noch deutlich verbesserungswürdigen Prognose von adulten ALL-Patienten sowie der häufigen Expression von CD133 bei KRK und B-ALL sollte präklinisch getestet werden, ob sich ein gegen CD133 gerichteter Fc-optimierter Antikörper im KRK und der B-ALL als Therapie eignet. Dabei sollten u.a. die Bindungseigenschaften von 293C3-SDIE auf KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen untersucht werden und getestet werden, ob 293C3-SDIE direkte Antikörpereffekte gegen KRK-Zelllinien auslöst, ob 293C3-SDIE eine antigenspezifische und potente NK Zell-Reaktivität (Aktivität, Degranulation und Interferon- γ Bildung) gegen KRK-Zelllinien und B-ALL induziert und eine Antikörper-abhängige Lyse auslöst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Eppendorf-Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS BD FACS Canto™ II	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS BD LSRFortessa™	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega, Fitchburg, WI, USA
Light Cycler 480	Roche, Basel, Schweiz
Minishaker MS1	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetteboy comfort	Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
Pipetten & Multikanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer, Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad W22	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Glas- und Verbrauchswaren

Abdeckfolie für qPCR	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
----------------------	---

Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten, steril	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Gefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Corning Inc., Corning, NY, USA
Glasflaschen (250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l)	Schott, Mainz, Deutschland
Pasteurpipetten, long size	WU, Bamberg, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	VWR, Darmstadt, Deutschland
Platten für CellTiter-Glo [®]	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Platten für ELISA (96 Well)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Platten für FACS (96 Well)	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Platten für qPCR	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturplatten (24, 96 Well)	Corning Inc., Corning, NY, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution)	BioLegend, San Diego, USA
Acutase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BATDA reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

BD GolgiStop	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
BD GolgiPlug	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bicoll-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
G418	Biochrom, Berlin, Deutschland
IMDM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Viviers, Belgien
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Abcam, Cambridge, UK
TMB MikroWell Peroxidase Substrate	SeraCare Life Science, Milford, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,1%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung	Lonza, Verviers, Belgien
Türk-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.4 Funktionelle Antikörper

293C3-SDIE	Bastian Schmied, Tübingen, Deutschland ⁸⁴
Cetuximab, hlgG1	Universitätsapotheke Tübingen

iso-SDIE	Bastian Schmied, Tübingen, Deutschland ⁸⁴
Panitumumab, IgG2k	Universitätsapotheke Tübingen

2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Esel-anti-Human PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus PE	Dako, Glostrup, Dänemark
Humanes IgG (hIgG)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes IgG1 (hIgG1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Humanes IgG2, kappa (hIgG2)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Maus anti-Human CD3-APC/Fire750	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD3-eFlour450	eBioscience, San Diego, USA
Maus anti-Human CD10-PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD19-FITC	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD20-BV 421	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD34-APC	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD56-APC	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD69-PE	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Maus anti-Human CD107a-PE	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Maus anti-Human CD133 (Klon W6B3C1; mIgG1)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus anti-Human CD133 (Klon 293C3; IgG2b)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus anti-Human CD133 (Klon AC133; mIgG1)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus IgG1 (mIgG1)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Maus IgG2b (mIgG2b)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
poly-HRP 20 Streptavidin	Fitzgerald Industries International

2.1.6 Kits

CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell	Promega, Fitchburg, WI, USA
---	-----------------------------

Viability Assay	
CellTrace™ Violet cell proliferation dye	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
High pure RNA Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
FastGene Scriptase II	NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland
INF-γ ELISA mAb set	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR Green I MasterMix	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1.7 Primer

Die Primer für die 18S ribosomale RNA (rRNA) wurden als QuantiTect Primer Assay, ohne Kenntnis der Primersequenz, von Qiagen (Hilden, Deutschland) erworben.

Primer für die CD133 Transkripte wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) erworben.

CD133	Forward	5'-TGGGGCTGCTGTTTATTATTCT-3'
	Reverse	5'-TGCCACAAAACCATAGAAGATG-3'

2.1.8 Zelllinien

B16F10-CD133	Bastian Schmied, Tübingen, Deutschland ⁸⁴
B16F10-FLT3	Bastian Schmied, Tübingen, Deutschland ⁸⁴
Caco-2	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HCT-116	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HT-29	American Type Culture Collection, Manassas, USA
REH	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
RS4;11	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SEM	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

2.1.9 Puffer

ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,5% Tween 20
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 0,01% NaN ₃

2.1.10 Medien

ALL Zellkulturmedium	RPMI + 10% FCS + 1% P/S IMDM + 10% FCS + 1% P/S
Einfriermedium	RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO
KRK Zellkulturmedium	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
B16F10 Medium	DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 1 µg/ml G418
PBMC Medium	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S

2.1.11 Computersoftware

EndNote X9	EndNote, Philadelphia, PA, USA
FlowJo vX.0.7	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

Für die Inkubation aller Versuchsansätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, die Standardbedingungen in einem Brutschrank von 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ verwendet. Routinemäßig wurde, soweit nicht abweichend angegeben, die Zentrifugation von Zellen bei 1.500 rpm für 5 min durchgeführt. Die Zellzählung von viablen Zellen erfolgte durch Verdünnung mit einer 0,1%-igen Trypanblau-Lösung oder in Fällen von Zellsuspensionen mit erhöhtem Erythrozytengehalt mit Türk-Lösung, jeweils in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Primärmaterial und Zelllinien wurden zur langfristigen Lagerung kryokonserviert. Die Zellen wurden vor dem Einfrieren gezählt, zentrifugiert und mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ /ml (Primärmaterial) oder $0,5 \times 10^7$ /ml (Zelllinien) in Einfriermedium resuspendiert. Sofort im Anschluss wurden sie in sterile Kryoröhrchen (je 1 ml) abgefüllt und bei -80 °C eingefroren. Eingefrorene Zellen wurden innerhalb weniger Tage zur Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt. Zum Auftauen von Zellen wurde diese in ihren Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in 10 ml Medium überführt, zentrifugiert und im Anschluss in neuem Medium resuspendiert. Zelllinien wurden zu Beginn des Projekts in mehreren Aliquots am selben Tag eingefroren und dann in 4 – 6 Wochen Abständen jeweils erneut aufgetaut. Vor Verwendung in funktionellen Ansätzen wurden sie mindestens 5 Tage im Voraus kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten KRK-Zelllinien Caco-2, HCT-116, HT-29 und die murinen B16F10-CD133/FLT3-Transfektanten sind adhärenente Zellen. Die verwendeten B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 sind Suspensionszelllinien. Zur Kultivierung wurden die Zellen alle 2 - 3 Tage nach Ablösung (nur adhärenente Zelllinien) und Zentrifugation in frischem Medium versorgt und in der gewünschten Zelldichte

ausgesät (siehe unten). Vom Boden abgelöst wurden die Zellen nach einmaliger Spülung mit PBS mittels 1-2 ml Trypsin-EDTA und anschließender fünfminütiger Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen. An Versuchstagen erfolgte die Ablösung mittels Accutase und die betreffenden Zellen wurden am Vortag frisch versorgt. B16F10-CD133/FLT3-Transfektanten wurde zusätzlich G418 (1:50), ein Aminoglykosid als Selektionssubstanz, ab dem zweiten Tag nach dem Auftauen ins Medium zugegeben. In der nachfolgenden Übersicht sind die Versorgung und das verwendete Medium der jeweiligen Zelllinie aufgelistet:

Caco-2	0,2-2x10 ⁶ Zellen/ml	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
HCT-116	0,5-2x10 ⁶ Zellen/ml	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
HT-29	0,2-2x10 ⁶ Zellen/ml	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
B16F10- CD133/FLT3	0,2x10 ⁶ Zellen/ml	DMEM + 10% FCS + 1% P/S + G418 (1:50)
REH	0,2-2x10 ⁶ Zellen/ml	RPMI + 10% FCS + 1% P/S
RS4;11	0,3-2x10 ⁶ Zellen/ml	RPMI + 10% FCS + 1% P/S
SEM	0,5-2x10 ⁶ Zellen/ml	IMDM + 10% FCS + 1% P/S

2.2.1.3 Gewinnung, Isolation und Konservierung von humanem Spendermaterial

Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission (Aktenzeichen: 13/2007V) und mit dem freiwilligen Einverständnis der Spender wurde Material zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von gesunden Probanden und B-ALL Patienten entnommen.

Zur Isolation von PBMC gesunder Spender wurden Leukaphereseprodukte (Blutkegel) der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen genutzt. Die Isolation der PBMC von Leukämiepatienten erfolgte aus mit Heparin versetzten Vollblut².

Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem gespendeten Material isoliert. Hierzu wurde eine isotonische Bicolll-Lösung (1,077 g/ml) verwendet. Diese beinhaltet ein synthetisches, stark verzweigtes und vernetztes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin (Saccharose-

Epichlorhydrin-Copolymer). Nach Zugabe von Blut und anschließender Zentrifugation fraktionieren sich die einzelnen Blutbestandteile aufgrund von Dichteunterschieden. Mononukleäre Zellen reichern sich in der Interphase zwischen Plasma, das Thrombozyten enthält, und der Bicolll-Lösung an. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren durch ihr größeres spezifisches Gewicht am Boden. Vor dem Auftragen wurden das Blut aus den Blutkegeln im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und im Anschluss in 35 ml über 15 ml vorgelegter Bicolll-Lösung aufgeschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2.000 rpm für 18 min (ohne Bremse) wurden die innerhalb der Interphase angereicherten Zellen (PBMC) abgenommen und zusätzlich dreimal mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 1.500 rpm für 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte zur Abtrennung von Thrombozyten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 800 rpm für 10 min. Schließlich wurde die PBMC in PBS resuspendiert, gezählt und kryokonserviert².

2.2.2 Durchflusszytometrie

Zur Messung der Expression verschiedener Oberflächenproteine auf Zellen (CD, Cluster of Differentiation), sowie der Bindung von 293C3-SDIE auf der Zelloberfläche wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der hydrodynamischen bzw. akustischen Fokussierung, worunter man die Erzeugung eines mit Zellen gefüllten Flüssigkeitsstroms versteht. Dadurch können die Zellen einzeln, nacheinander durch gebündelte Laserstrahlen geleitet werden. Die Streuung des Lichts an den Zellen kann dafür genutzt werden, die Größe (FSC, Vorwärtsstreulicht) als auch die Granularität (SSC, Seitwärtsstreulicht) zu messen. Die Expression von Oberflächenproteinen wird nach Inkubation mit direkt oder indirekt fluoreszenzmarkierten Antikörpern gemessen. Durch die Anregung der Fluorochrome mittels Laserstrahlen diese Photonen einer bestimmten Wellenlänge aus, die durch Filter (Longpass-/Bandpassfilter) auf eine Fotodiode geleitet werden, welche die Lichtintensität messen kann. Durch Laser verschiedener Wellenlängen ist es möglich die Expression mehrerer Oberflächenproteine gleichzeitig auf einer Zelle zu bestimmen. Für die Messung wurden das BD FACS Canto™ II und das BD

FACS Fortessa™ verwendet. Im Anschluss wurde das Analyse-Programm FlowJo vX.0.7 zur Auswertung der Ergebnisse benutzt.

2.2.2.1 Allgemeine Färbehinweise

Dieses Kapitel fasst Schritte in der Färbung von durchflusszytometrischen Experimenten zusammen, die beständig durchgeführt wurden. Nach Zugabe von Zellen in eine FACS-Platte (96 Well) wurden diese vor der ersten Färbung bei 2.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Diese Parametereinstellung der Zentrifuge wurde beständig in allen Zentrifugationsschritten mit FACS-Platten genutzt. Nach Verwerfung der Überstände erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen die Inkubation mit 10 µg/ml mIgG1 oder hIgG in FACS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur (RT). Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt und Verwerfung des Überstandes wurden die Zellpellets in einem dreischrittigen Prozess gefärbt. Die Zellen wurden zuerst mit Primärantikörpern (unmarkiert) für 25 min bei RT, mit Sekundärantikörpern für 15 min bei RT im Dunkeln und abschließend mit Selektionsantikörpern für 15 min bei RT im Dunkeln in je 50 µl FACS-Puffer gefärbt. Zwischen jedem Färbeschritt erfolgten zwei Waschschriffe mit FACS-Puffer und vorheriger/anschließender Zentrifugation, Resuspension und Verwerfung des Überstandes. Die eingesetzten Konzentrationen der Primärantikörper finden sich in den Abbildungslegenden und den jeweiligen Methodenkapiteln. PE-gelabelte Sekundärantikörper wurden 1:100 verdünnt und direkt markierte Antikörper wurden nach Herstellerangaben oder mit im Labor etablierten Verdünnungen verwendet. Isotypkontrollen wurden in der gleichen Konzentration wie die entsprechenden Antikörper eingesetzt. Für den Fall der Verwendung von nur direkt-markierten Antikörpern entfielen die beiden ersten Färbeschriffe. Abschließend erfolgte ein letzter Waschschriff, eine Resuspension in je 100 µl FACS-Puffer und anschließende die Überführung in FACS-Röhrchen. 15 min vor der Messung wurden die Proben, zum späteren Ausschluss toter Zellen, mit 7-AAD (1:100) versetzt sowie im Dunkeln auf Eis gelagert.

2.2.2.2 CD133 Expression auf KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen

Zur Bestimmung der CD133 Expression auf den KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116

und Caco-2, der B-ALL-Zelllinie SEM und primären Zellen von B-ALL-Patienten wurden die Zielzellen zu je $0,5 \times 10^6$ /Well in eine FACS-Platte gegeben. Die Zellen wurden gemäß Färbeprotokoll aus 2.2.2.1 mit den drei murinen CD133 Primärantikörpern (293C3, AC133 und W6B3C1) mit $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ oder den angegebenen Titrationsschritten und entsprechenden Isotypkontrollen (mIgG1 oder mIgG2b) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-PE Konjugat eingesetzt. Im Fall von primären Zellen erfolgte eine Selektionsfärbung mit einer Auswahl der B-ALL-Marker: CD10-PE-Cy7, CD19-FITC, CD20-BV 421 und CD34-APC. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde aus der Software FlowJo vX.0.7 ausgelesen. Die Berechnung des SFI (spezifischer Fluoreszenzindex) erfolgte mittels folgender Formel:

$$SFI = \frac{MFI(CD133)}{MFI(Isotyp)}$$

2.2.2.3 Bindungsanalyse von 293C3-SDIE auf B16F10-Transfektanten, KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen

Zur Analyse des Bindungsverhaltens des produzierten 293C3-SDIE wurde auf B16F10-CD133/FLT3-Transfektanten eine Kontrolle der Spezifität sowie eine mit dem murinen CD133 Antikörperklon 293C3 vergleichende Bindungstitration durchgeführt. Des Weiteren wurden Bindungstitrationen von 293C3-SDIE auf den drei KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2, den B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 sowie primärer Zellen von B-ALL-Patienten ($\geq 96\%$ Blastenanteil) gemessen. Hierzu wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen je Well je Färbeprobe in eine FACS Platte gegeben. Die Färbung erfolgte gemäß dem Färbeprotokoll aus 2.2.2.1 mit den Primärantikörpern 293C3-SDIE oder dem murinen CD133 Antikörperklon 293C3 und den entsprechenden Isotypkontrollen iso-SDIE oder mIgG2b. Alle Antikörper wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ oder den entsprechenden Titrationsschritten eingesetzt. Als Sekundärantikörper für 293C3-SDIE und iso-SDIE diente ein Esel-anti-Human-PE Konjugat und für die murinen Antikörper ein Ziege-anti-Maus-PE Konjugat (jeweils 1:100).

2.2.2.4 EGFR Expression auf KRK-Zelllinien

Zur Bestimmung der EGFR Expression auf den KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116

und Caco-2 wurden die Zielzellen zu je $0,5 \times 10^6$ /Well in eine FACS-Platte gegeben. Die Zellen wurden gemäß Färbeprotokoll aus 2.2.2.1 mit den Antikörpern 293C3-SDIE, Cetuximab und Panitumumab mit $10 \mu\text{g/ml}$ und entsprechenden Isotypkontrollen (iso-SDIE, hIgG1 oder hIgG2, kappa) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Esel-anti-Human-PE Konjugat eingesetzt. Die Berechnung des SFI (spezifischer Fluoreszenzindex) erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.2.5 NK Zell-Aktivität (CD69 Assay)

CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker, der in diesem Ansatz zur Analyse der NK Zell-Aktivierung verwendet wurde²⁰⁵. Vor Beginn des Ansatzes wurden PBMC gesunder Spender aufgetaut und in einer Kulturflasche in PBMC Medium für 18 - 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PBMC in einer 96-Well Flachbodenplatte à $0,5 \times 10^6$ Zellen/Well in je $100 \mu\text{l}$ /Well PBMC-Medium vorgelegt. Vor der Kokultivierung wurden B-ALL-Zellen mit $1 \mu\text{M}$ CellTrace™ Violet cell proliferation dye beladen. Die KRK-Zellen und B-ALL wurden à $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in je $50 \mu\text{l}$ /Well in einem E:T-Verhältnis (*effector-to-target*) von 2,5:1 dazugegeben. Zusätzlich wurde 293C3-SDIE und iso-SDIE in der finalen Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ in $50 \mu\text{l}$ /Well PBMC-Medium eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37° wurden die Zellen zur Durchflusszytometrie mit CD69-PE und Selektionsmarkern für humane NK Zellen CD56-APC und CD3-eFlour450 (KRK-Teil) bzw. CD3-APC/Fire750 (B-ALL-Teil) gemäß Färbeprotokoll aus Kapitel 2.2.2.1 gefärbt.

2.2.2.6 NK Zell-Degranulation (CD107a-Ansatz)

CD107a ist ein Oberflächenexpressionsmarker, der als Surrogatmarker für NK Zell-Degranulation verwendet werden kann. Nach Aktivierung einer NK Zelle kommt es zur Verschmelzung von CD107a tragenden Vesikeln mit der Zelloberflächenmembran und dadurch zur Ausschüttung lytischer Substanzen^{2,50}. Vor Beginn des Ansatzes wurden PBMC gesunder Spender aufgetaut und in einer Kulturflasche in PBMC Medium für 18 - 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PBMC in einer 96-Well Rundbodenplatte à $0,5 \times 10^6$ Zellen/Well in $100 \mu\text{l}$ PBMC-Medium vorgelegt. Vor der Kokultivierung

wurden die B-ALL-Zellen mit 1 μM CellTrace™ Violet cell proliferation dye beladen. Die KRK-Zellen und B-ALL-Zellen ($0,2 \times 10^6$ Zellen/Well, E:T-Verhältnis 2,5:1) wurden für 30 min mit 293C3-SDIE oder iso-SDIE (finale Konzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBMC-Medium vorinkubiert und danach in je 50 μl /Well hinzugegeben. Danach wurden in weiteren 50 μl PBMC Medium der CD107a-PE Antikörper (finale Verdünnung 1:25) zusammen mit BD Golgi-Plug und BD Golgi-Stop (finale Verdünnung jeweils: 1:1000) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 4 h wurden die Zellen mit den NK Zell Selektionsmarkern CD56-APC und CD3-eFlour450 (KRK-Teil) bzw. CD3-APC/Fire750 (B-ALL-Teil) für die anschließende Durchflusszytometrie gemäß Färbeprotokoll aus Kapitel 2.2.2.1 gefärbt.

2.2.3 mRNA Analyse

2.2.3.1 Aufreinigung von RNA

Zur Gewinnung von RNA aus den KRK-Zelllinien wurden jeweils 5×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und der Überstand abgesaugt. Mittels des High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland), das nach Herstellerangaben verwendet wurde, erfolgte die Aufreinigung der zellulären Gesamt-RNA aus den Zellpellets. Die RNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt.

2.2.3.2 cDNA Synthese durch reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde daraufhin mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in einzelsträngige *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben, die in der nachfolgenden qPCR verwendet wurde. Dies wurde mit dem FastGene Scriptase II Kit (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland) durchgeführt, das nach Herstellerangaben angewendet wurde.

2.2.3.3 qPCR zur Bestimmung der CD133 RNA Expression

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, die eine schnelle und hochspezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten erlaubt. Hierzu wird eine thermostabile DNA-Polymerase und spezifische Oligonukleotid-Primer (ca. 20-30bp) benötigt. Die DNA-Abschnitte werden in mehreren Zyklen

amplifiziert, in denen jeweils die drei Phasen Denaturierung (doppelsträngige DNA wird einzelsträngig), Annealing (Anlagerung von Primerpaaren) und Elongation (Anlagerung von Nukleotiden an Primer) durchlaufen werden. In einer quantitativen PCR (qPCR) wird die PCR dazu genutzt, die absolute oder relative Menge eines DNA-Abschnittes in einer Probe zu messen. Für die Quantifikation wird eine fluoreszierende, nicht erweiterbare, DNA-bindende Sonde verwendet, mit der die PCR in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert hierbei mit der Menge an vorhandener DNA. In einer qPCR misst man nun einen *threshold cycle* (C_t) in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über der Hintergrundfluoreszenz liegt. In der relativen mRNA Analyse dieser Arbeit wurden nun durch Ermittlung des C_t die Menge von in cDNA umgeschriebener RNA von KRK-Zelllinien (x) mit der Menge von zu cDNA umgeschriebenen RNA eines Referenzgens (q) verglichen. Die Formel dafür ist Teil der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode²⁰⁶:

$$\text{Relative Menge an Zielgen} = 2^{-\Delta C_t}$$

$$\Delta C_t = C_{t,x} - C_{t,q}$$

x: getestet Probe, q: Referenzgen

Für die Analyse der CD133 mRNA Expression wurde SYBR Green I, ein in doppelsträngige DNA interkalierender fluoreszierender Farbstoff, als Sonde verwendet. Als Referenzgen wurde die 18sRNA ausgewählt. Für die qPCR wurde ein Reaktionsgemisch aus 12,5 μ l SYBR Green I MasterMix, 9 μ l ddH₂O, 1 μ l cDNA und 1 μ l CD133 Primer-Mix oder je 0,5 μ l der beiden 18sRNA Primer hergestellt. Die Messung und Analyse wurden in einem Light Cycler 480 und der beinhalteten Software mit 40 Zyklen durchgeführt.

2.2.4 CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay

Die Viabilität der KRK-Zelllinien wurde mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Dieser Assay verwendet die Quantifizierung des ATP Gehaltes in einer Zellkultur für den Rückschluss auf die Anzahl metabolisch aktiver, viabler Zellen. Chemische Grundlage für diese Quantifizierung ist hierbei

die Umwandlung von Luciferin zum lumineszierenden Oxyluciferin durch die Ultra-Glo™ rLuciferase, bei welcher ATP benötigt wird. Zur Freisetzung des ATPs werden die Zellen vorher lysiert. Die Höhe des Lumineszenzsignals ist hierbei in einem bestimmten Bereich direkt proportional zum Gehalt an viablen Zellen in der Kultur.

Für die Messung direkter Antikörpereffekte auf die Viabilität der KRK-Zellen wurden diese in einer weißen 96-Well Flachbodenplatte à 5000 Zellen/Well (Caco-2 und HCT-119) oder 8000 Zellen/Well (HT-29) ausgesät und mit 293C3-SDIE, iso-SDIE, Cetuximab, Panitumumab oder Kombination aus diesen Antikörpern in der Konzentration 1 µg/ml für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin in der Konzentration 1,25 µM verwendet. Die anschließende Verwendung des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay erfolgte nach Herstellerangaben. Dies beinhaltete das Hinzufügen von 100 µl CellTiter-Glo® Reagens, 15 min Inkubation und Messung am GloMax® 96 Microplate Luminometer von Promega.

2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Begriff ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent-Assay und beschreibt eine immunologische, antikörperbasierte Nachweismethode, mit der die Konzentration eines Moleküls quantifiziert werden kann. Grundlage hierfür sind Antigen-Antikörper Reaktionen sowie eine Farbstoffreaktion durch ein gekoppeltes Enzym. In dieser Arbeit wurde ein *Sandwich-ELISA* verwendet. Hierfür wird zuerst ein gegen das Zielmolekül gerichteter Antikörper (*capture*) an Plastik nicht-kovalent, unspezifisch adsorbiert. Nach dem Blocken weiterer unspezifischer Bindungsstellen durch Bovines Serumalbumin (BSA) wird die zu testende Probe mit dem Zielmolekül dazugegeben. Nach einem Waschschrift verbleibt allein das Zielmolekül Antikörper-gebunden auf der ELISA Platte und kann nun mittels eines sekundären Antikörpers (*detection antibody*), der ein anderes Epitop erkennt, spezifisch gebunden werden. Im nächsten Schritt wird ein gekoppeltes Enzym z. B. Streptavidin-HRP (im Fall eines biotinylierten sekundären Antikörpers) oder ein tertiärer Antikörper mit gekoppeltem Enzym hinzugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wird nun ein chromogenes

Substrat z. B. TMB hinzugegeben, welches durch das Enzym in ein Reaktionsprodukt passender Wellenlänge umgewandelt wird. Die Signalintensität dieses Reaktionsproduktes korreliert nun mit der Konzentration des Zielmoleküls in der Probe. Mittels eines gemessenen Standards und einer berechneten Standardkurve kann nun die Konzentration des Zielmoleküls ermittelt werden.

2.2.5.1 ELISA für humanes IFN- γ

Für den IFN- γ ELISA wurde der *capture*-Antikörper M-700A (0,3 $\mu\text{g/ml}$ in Carbonat-Bicarbonat-Puffer; 100 μl je Well) bei 4 °C über Nacht an einer Proteinbindenden ELISA-Platte (96 Well) adsorbiert. Am Tag darauf wurde der Überstand abgesaugt und drei Waschschriffe mit Waschpuffer durchgeführt. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen erfolgte danach die Zugabe von 1% BSA-PBS (200 μl je Well) für 1 h bei RT. Nach Absaugung der Blocklösung wurden die Standards (in Dupletts; beginnend mit 3 ng/ml Titration 1:3) sowie die entsprechenden Proben hinzugegeben und für 1 - 2 h bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe/Inkubation des biotinylierten *detection*-Antikörpers M701B (1 $\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA-PBS; 50 μl je Well) für 1 – 2 h bei RT. Nach fünf folgenden Waschschriffen wurde Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:8.000 in 1% BSA-PBS; 100 μl je Well) hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Nach weiteren sechs Waschschriffen erfolgte die Zugabe der Substratlösung TMB (100 μl je Well). Nach 15 - 30 min wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 1 M H_3PO_4 (100 μl je Well) gestoppt. Die Messung wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader durchgeführt².

2.2.6 NK Zell-vermittelte Zytotoxizität (BATDA-Europium-Assay)

Zur Messung der NK Zell-vermittelten Zytotoxizität wurde ein BATDA-Europium Zytotoxizitätsansatz durchgeführt. Hierfür werden Zielzellen mit dem Acetoxymethylester BATDA (*2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylacid acetoxymethylester*) inkubiert. BATDA penetriert durch die Zellmembran und wird intrazellulär an der im Reagenz befindlichen Esterbindung zu TDA hydrolysiert. TDA kann nicht durch die lipophile Zellmembran diffundieren. Nachfolgende Waschschriffe reinigen den umgebenden Zellkulturüberstand von BATDA

Resten. Durch experimentell ausgelöste Zielzelllyse wird TDA nun ins optimaler weise BATDA freie Medium freigegeben. Freies TDA wird mittels Zugabe von Europium quantitativ gemessen. Europium bildet hierbei mit TDA einen stabilen, fluoreszierenden Chelatkomplex (EuTDA). Die Signalintensität von EuTDA korreliert mit der Menge an freigegebener TDA und dementsprechend mit der Menge an lysierten Zellen. Folgende Formel kommt hierbei zur Anwendung²:

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

Im Ansatz wurden 2×10^6 Zielzellen mit 4 μl BATDA-Lösung in 2 ml PBMC Medium aufgenommen und unter regelmäßigem Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgten fünf Waschschrte mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium und jeweils anschließender Zentrifugation bei 300 g für 7 min. Nach Einstellung der Zellzahl auf 5×10^4 Zellen je ml wurden die Zielzellen mit 293C3-SDIE oder iso-SDIE für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden je 100 μl (5×10^3 Zielzellen/Well) in eine 96 Well-Platte pipettiert. Die verwendeten PBMC wurden am Vortag aufgetaut und für 18 – 24 h bei 37 °C inkubiert. Am Tag des Experimentes wurden die PBMC auf drei E:T-Verhältnisse (80:1, 40:1 und 20:1) eingestellt und in 100 μl je Well zu den Zielzellen hinzugegeben. Zur Messung der Spontanfreisetzung von TDA und der maximalen TDA-Freisetzung der Zielzellen wurden weitere Wells mit 100 μl Medium oder 100 μl 1%-iger Triton X-100 Lösung anstatt der Zugabe von Effektorzellen angesetzt. Vor der nachfolgenden 2 h Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 100 g für 2 min. Nach der Inkubationszeit wurde erneuert bei 200 g für 5 min zentrifugiert und anschließend je Well 20 μl Zellkulturüberstand in eine neue 96-Well Flachbodenplatte überführt. In diese wurde jeweils 200 μl Europium-Lösung hinzugegeben. Nach frühestens 15 min erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität am Multilabel Counter Victor 1420.

2.2.7 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism 8 durchgeführt. Das Konfidenzniveau wurde auf 95% festgelegt. Für normalverteilte Daten (Shapiro-Wilk-Test) wurden die p-Werte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Tukey post-hoc) berechnet. Für alle Angaben gilt: p: p-Wert; *: signifikant; ns: nicht

signifikant.

3 Ergebnisseⁱ

3.1 Bindung muriner CD133 Antikörperklone auf KRK-Zelllinien

In Voruntersuchungen mit primären AML-Zellen durch Körner et al. konnten Unterschiede in den Bindungseigenschaften dreier verschiedener muriner anti-humaner CD133 Antikörperklone (AC133, 293C3, W6B3C1) festgestellt werden. Durchflusszytometrische Experimente zeigten, dass der Antikörperklon 293C3 bezüglich seiner Bindungseigenschaften auf AML-Zellen am geeignetsten für die Entwicklung eines humanisierten Fc-optimierten CD133 Antikörpers ist²⁰⁴. Da die Bindungseigenschaften von CD133 Antikörperklonen auf KRK-Zelllinien sich aufgrund unterschiedlicher Splicing-Varianten und Glykosylierungen von CD133 ebenfalls unterscheiden könnten, wurde die Bindung der murinen Antikörperklone AC133, 293C3 und W6B3C1 bei dieser Tumorentität durchflusszytometrisch vergleichend getestet. Hierzu wurden vorab drei zur Testung geeignete KRK-Zelllinien in der Literatur identifiziert und zunächst die CD133 mRNA Expression mittels quantitativer PCR bestimmt.

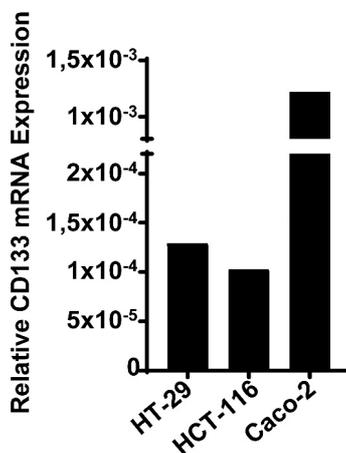


Abbildung 3: Bestimmung der relativen CD133 mRNA Expression in drei KRK-Zelllinien. Die relative CD133 mRNA Expression der drei KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 wurde mittels quantitativer PCR mit 18sRNA als Referenzgen bestimmt. Dargestellt ist pro Zelllinie je ein exemplarisches Ergebnis von insgesamt 2 Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen. Abbildungsvorlage aus⁸⁴ (Daten nicht identisch).

ⁱ Der Großteil der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ist in bereits veröffentlichten Publikationen eingeflossen (siehe Kapitel 8)^{84,161}. Deshalb sind inhaltliche Überschneidungen mit dem Ergebnis- bzw. Abbildungstext der genannten Publikationen unvermeidbar und sollen im Sinne der guten wissenschaftlichen Praxis hiermit klar benannt und gekennzeichnet werden.

Die quantitative PCR zeigte, dass die relative mRNA Expression zwischen den drei getesteten KRK-Zelllinien erheblich variiert und die KRK-Zelllinie Caco-2 am meisten CD133 mRNA exprimiert. In der anschließenden vergleichenden Dosistitration hinsichtlich der Bindung der drei murinen CD133 Antikörperklone wurde deshalb die KRK-Zelllinie Caco-2 ausgewählt, um für eine spätere vergleichende Testung auf allen gewählten KRK-Zelllinien eine saturierende Dosis zu bestimmen.

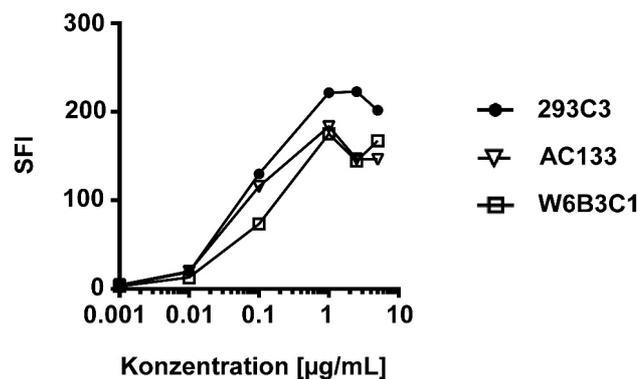


Abbildung 4: Titration der murinen CD133 Antikörperklone auf Caco-2 Zellen.

Die KRK-Zelllinie Caco-2 wurde mit ansteigenden Konzentrationen der drei murinen CD133 Antikörperklone 293C3, AC133, W6B3C1 und entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von insgesamt 2 Versuchen mit ähnlichen Resultaten. SFI: spezifischer Fluoreszenzindex. Abbildungsvorlage aus⁸⁴ (Daten nicht identisch).

Alle drei getesteten murinen CD133 Antikörperklone erreichten eine saturierende Konzentration bei 1 $\mu\text{g/ml}$. Diese Konzentration wurde deshalb für die folgende vergleichende durchflusszytometrische Analyse der drei CD133 Antikörperklone auf den drei KRK-Zelllinien verwendet.

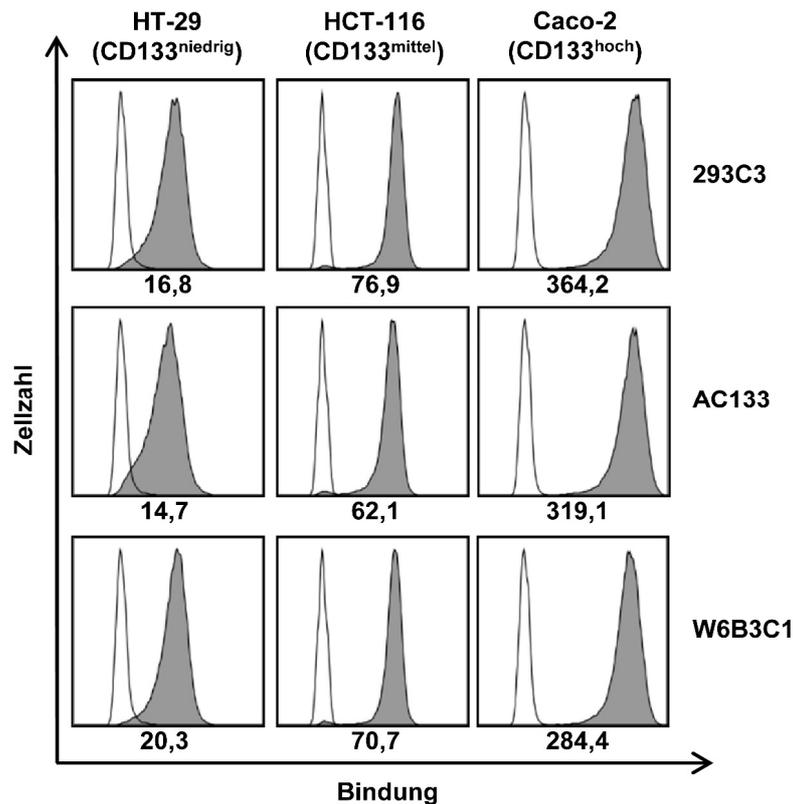


Abbildung 5: Vergleich muriner CD133 Antikörperklone auf drei KRK-Zelllinien. Die drei KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 wurden mit je 1 µg/ml eines der drei murinen CD133 Antikörperklone 293C3, AC133 oder W6B3C1 (ausgefüllte Histogramme) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (leere Histogramme) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Unterhalb der Histogramme ist der jeweilige SFI gezeigt. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von insgesamt 2 Versuchen mit ähnlichen Resultaten. Daten sind in ⁸⁴ eingeflossen.

Es konnten keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Bindungseigenschaften der drei murinen CD133 Antikörper bei den drei getesteten KRK-Zelllinien festgestellt werden. Aufbauend auf den Studien zu 293C3-SDIE in der AML wurde deshalb der Klon 293C3 zur weiteren Verwendung in unserem therapeutischen Konstrukt ausgewählt.

3.2 Charakterisierung des Fc-optimierten CD133 Antikörpers 293C3-SDIE

Der parentale CD133 Antikörperklon 293C3 wurde dazu genutzt, ein Fc-optimiertes chimäres Konstrukt zu generieren. Hierzu wurde der Fc-Teil, speziell die C_H2-Fragmente des Antikörpers, durch den Austausch der Aminosäuren S239D/I332E (SDIE) modifiziert. Dadurch weist der Fc-Teil eine deutlich erhöhte

Affinität zum FcγRIIIa (CD16) auf. Als Kontrolle wurde ein Fc-optimierter Antikörper mit identischem Fc-Teil, jedoch ohne relevante Zielzellspezifität, hergestellt (iso-SDIE). Die Modifikation, die Generierung sowie die Herstellung dieser Antikörper sind in der Literatur beschrieben^{2,102,204}. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper 293C3-SDIE wurde von Bastian Schmied in einem CHO-Zellsystem in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gundram Jung (Universität Tübingen) hergestellt⁸⁴.

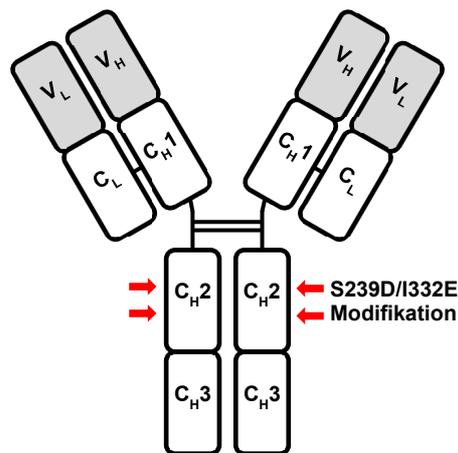


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Fc-optimierten Antikörpers 293C3-SDIE. Grau: murine Fragmente, weiß: humane Fragmente. Rote Pfeile symbolisieren die Aminosäuremodifikation S239D/I332E. C, constant; V, variable; H, heavy; L, light. Abbildung abgewandelt aus⁸⁴.

Nach der Produktionsphase wurde der Antikörper mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und einer Gelfiltration auf die erwartete Größe sowie auf eine mögliche Aggregatbildung überprüft. Der Antikörper zeigte die erwartete Größe von 148 kDa für den kompletten Antikörper sowie 24 kDa und 50 kDa für die leichte und schwere Kette. Eine Aggregatbildung konnte nicht festgestellt werden und der Antikörper konnte mit einer guten Ausbeute produziert werden⁸⁴. Diese Arbeiten wurden von Bastian Schmied durchgeführt (nicht gezeigt). Zur Feststellung einer möglichen Veränderung der Bindungseigenschaften des Antikörpers durch die Chimärisierung und die Fc-Modifikation wurde im Anschluss an die Produktion die Bindungsspezifität durchflusszytometrisch mit B16F10-CD133

(Positivkontrolle) bzw. B16F10-FLT3-Transfektanten sichergestellt.

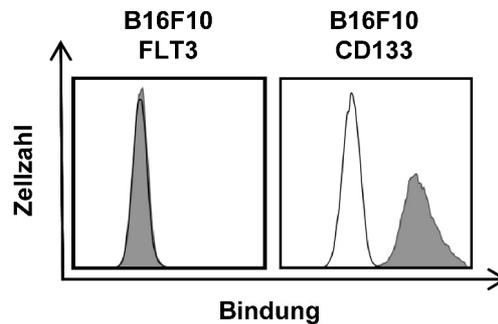


Abbildung 7: Charakterisierung der Spezifität von 293C3-SDIE.

B16F10-CD133- (Positivkontrolle) und B16F10-FLT3-Transfektanten (Negativkontrolle) wurden mit je 10 µg/ml des chimären Antikörpers 293C3-SDIE (ausgefüllte Histogramme) oder iso-SDIE (leere Histogramme) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Esel-anti-Human-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung abgewandelt aus ⁸⁴.

Die Durchflusszytometrie erbrachte ein positives Signal von 293C3-SDIE auf den B16F10-CD133-Transfektanten und kein Signal auf den B16F10-FLT3-Transfektanten. Damit wurde die Spezifität von 293C3-SDIE für CD133 bestätigt. Zusätzlich wurde eine vergleichende Bindungstiteration zwischen dem murinen CD133 Antikörperklon 293C3 sowie dem neu produzierten 293C3-SDIE Antikörper durchgeführt.

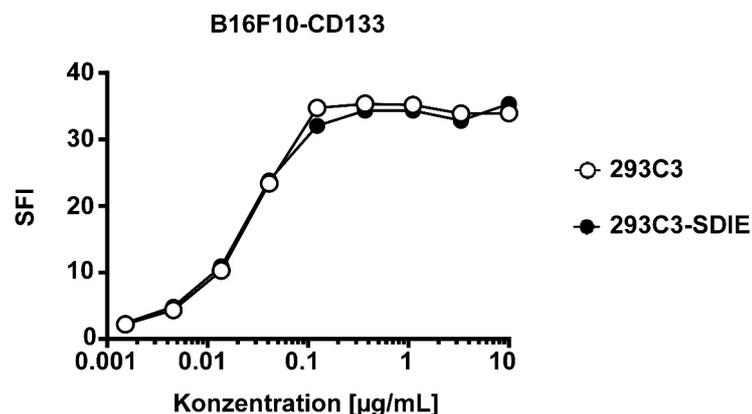


Abbildung 8: Vergleichende Bindungstiteration von 293C3-SDIE mit dem murinen CD133 Antikörperklon 293C3. B16F10-CD133-Transfektanten wurden mit ansteigenden Konzentrationen der Antikörper 293C3-SDIE, 293C3 und den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PE Konjugat oder Esel-anti-Human-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. SFI: spezifischer Fluoreszenzindex. Abbildung abgewandelt aus ⁸⁴.

Hierbei konnte eine Veränderung der Affinität zu CD133 ausgeschlossen werden. Anschließend wurde eine Dosistitration von 293C3-SDIE auf den drei KRK-Zelllinien durchgeführt. Dies diente der Ermittlung einer sättigenden Konzentration für spätere funktionelle Analysen.

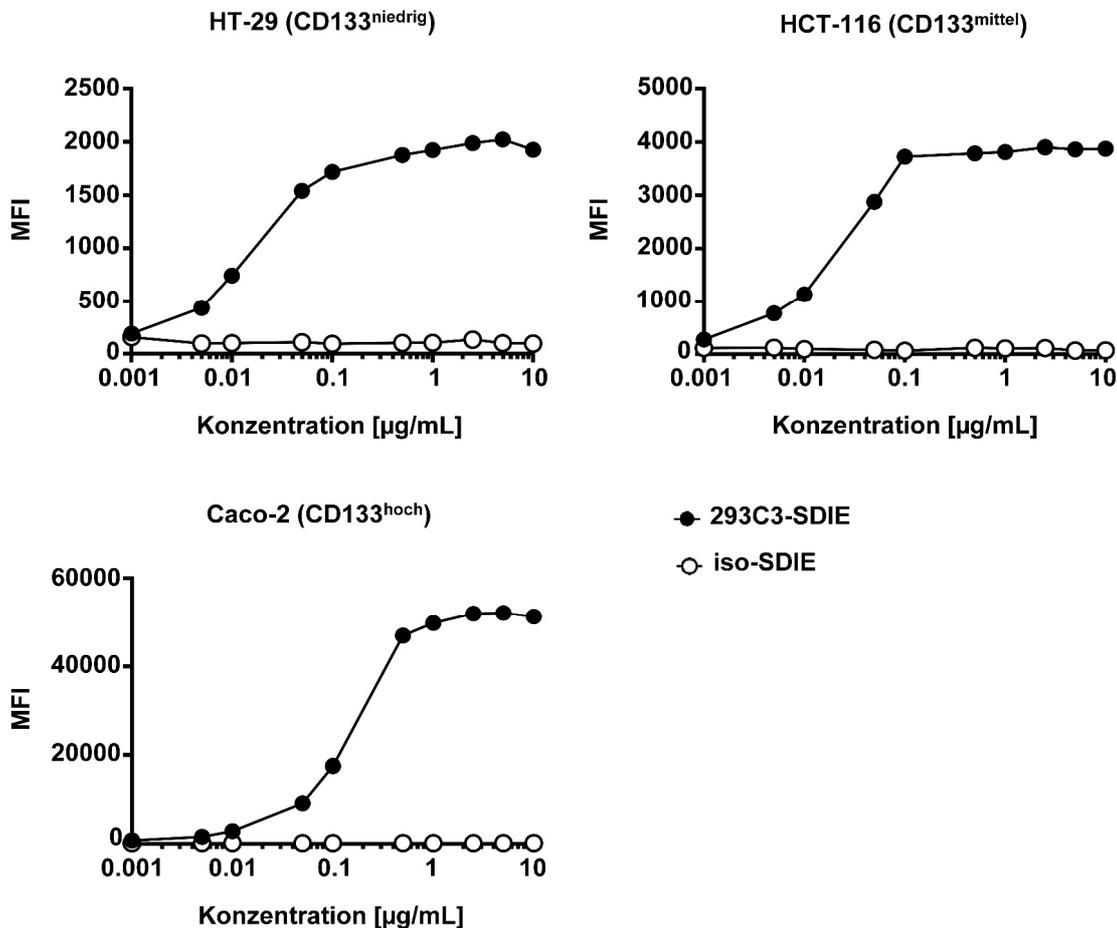


Abbildung 9: Titration des Antikörpers 293C3-SDIE auf drei KRK-Zelllinien.

Die KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 wurden mit ansteigenden Konzentrationen von 293C3-SDIE oder iso-SDIE inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Esel-anti-Human-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. Abbildung abgewandelt aus⁸⁴.

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass 1 µg/ml des Antikörpers 293C3-SDIE ausreichend ist, um eine saturierende Bindung auf allen drei getesteten KRK-Zelllinien zu erreichen. Dabei korrelierte das Bindungsverhalten positiv mit der Antigendichte. Aus diesen Ergebnissen begründet wurde 1 µg/ml als Konzentration für die weitere funktionelle Charakterisierung von 293C3-SDIE verwendet.

3.3 Direkte Effekte von 293C3-SDIE auf die Proliferation / Viabilität von KRK-Zelllinien

Wie bereits einleitend erwähnt, gibt es Hinweise in der wissenschaftlichen Literatur hinsichtlich einer Beteiligung von CD133 im Kontext des Überlebens und der Proliferation von Tumorzellen¹⁸¹. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob 293C3-SDIE vom Fc-Teil unabhängige, direkte Wirkungen auf die Proliferation bzw. die Viabilität von KRK-Zelllinien hat. Cetuximab und Panitumumab, zwei Antikörper die therapeutisch gegen den EGFR gerichtet sind und für die Therapie des metastasierenden KRK zugelassen sind, wurden als Vergleich verwendet. Vorbereitend wurde zunächst die Expression von EGFR auf den drei KRK-Zelllinien bestimmt.

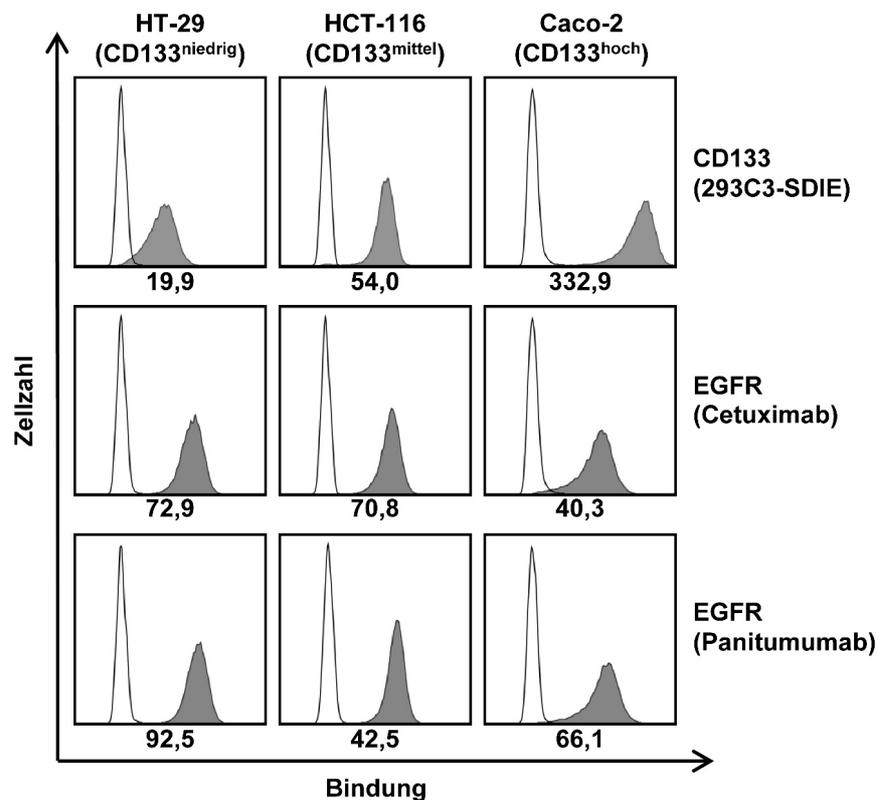


Abbildung 10: Expression von EGFR auf KRK-Zelllinien.

Die drei KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 wurden mit je 10 µg/ml 293C3-SDIE, Cetuximab oder Panitumumab (ausgefüllte Histogramme) bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle (leere Histogramme) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Esel-anti-Human-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Unterhalb der Histogramme ist der jeweilige SFI gezeigt. Abbildungsvorlage aus⁸⁴ (Daten nicht identisch).

Eine EGFR Expression konnte auf allen drei KRK-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Tabelle 1 fasst die gemessenen Expressionsdaten sowie weitere klinische Charakteristika der zur funktionellen Testung gewählten KRK-Zelllinien zusammen.

Tabelle 1: Charakteristika der funktionell verwendeten KRK-Zelllinien

Zelllinie ¹	Alter ¹	Ursprung ¹	KRAS ¹	MSI Status ¹	SFI CD133 ²	SFI EGFR ²
HT-29	44	Primärtumor	wt	MSS	19,9	40,3
HCT-166	48	Primärtumor	G13D	MSI	54,0	70,8
Caco-2	72	Primärtumor	wt	MSS	332,9	72,9

¹ Biologische Charakteristika stammen aus ^{84,207,208}. ² Werte wurden aus der Abbildung 11 entnommen. KRAS: Kirsten rat sarcoma viral antigen, MSS/MSI: Mikrosatelliten-stabil/-instabil, SFI: spezifischer Fluoreszenzindex. Tabelle wurde abgewandelt aus ⁸⁴.

Um einen direkten Einfluss von 293C3-SDIE, Cetuximab und Panitumumab auf die Proliferation bzw. Viabilität von KRK-Zelllinien zu untersuchen wurden diese, (ohne Immunzellen) mit den Antikörpern inkubiert. Als Surrogatmarker der Viabilität wurden die ATP Level mittels des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Da eine Interaktion von CD133 mit EGFR in der Literatur beschrieben wurde und CD133 an möglichen Resistenzmechanismen von gegen EGFR gerichteten Therapien beteiligt sein könnte, wurden auch Kombinationen der Antikörper geprüft ^{179,185}.

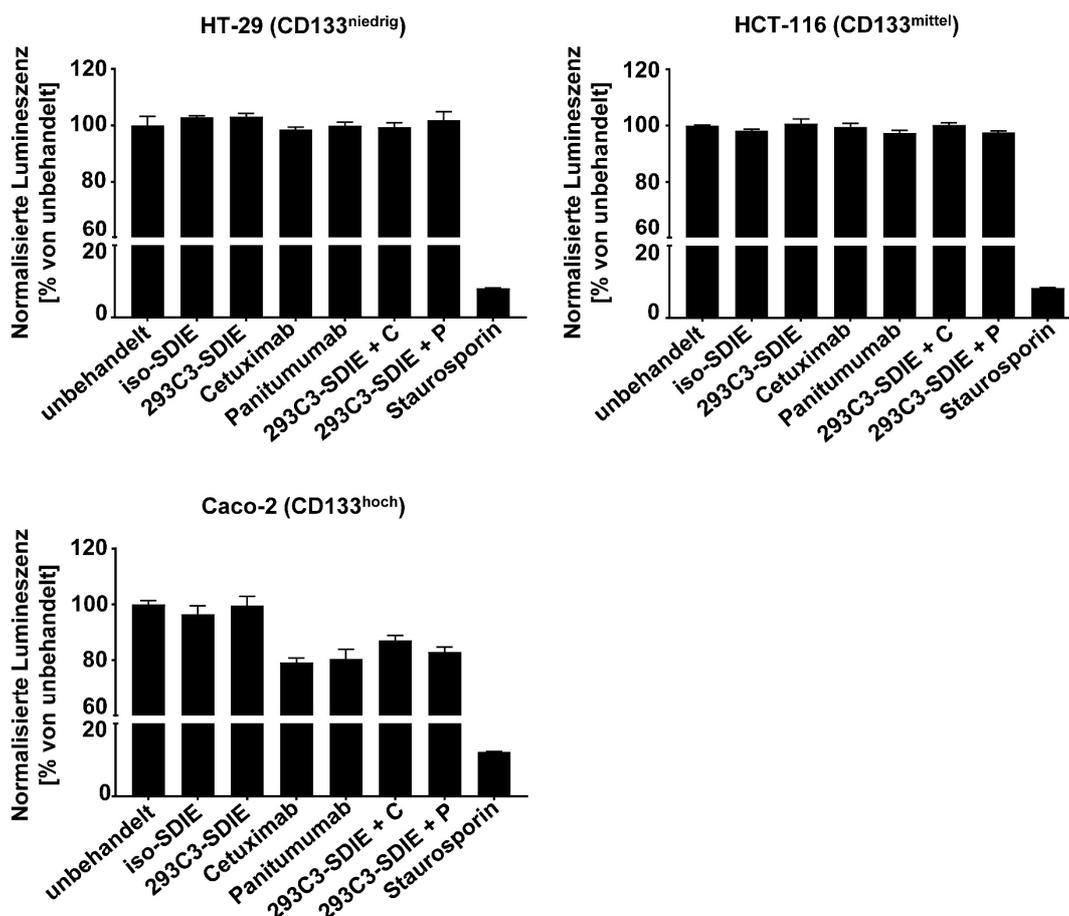


Abbildung 11: Direkte Antikörperwirkung von 293C3-SDIE auf die Proliferation / Viabilität von KRK-Zelllinien. Die KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 wurden mit je 1 µg/ml von 293C3-SDIE, Cetuximab, Panitumumab oder Kombinationen der Antikörper für 3 Tage inkubiert. Staurosporin wurde als Positivkontrolle in der Konzentration 1,25µM verwendet. Die ATP Level wurden mithilfe des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Auf der y-Achse dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Tumorzellen, normalisiert zur unbehandelten Probe. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Dargestellt sind exemplarische Daten von insgesamt 3 Versuchen mit ähnlichen Resultaten. C: Cetuximab, P: Panitumumab. Abbildungsvorlage aus ⁸⁴ (Daten nicht identisch).

Ein direkter Effekt von 293C3-SDIE auf die Viabilität der KRK-Zelllinien HT-29, HCT-116 und Caco-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Durch die gegen den EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab und Panitumumab konnte die Viabilität von Caco-2 negativ beeinflusst werden. Auf die Zelllinien HCT-116 und HT-29 hatten diese keine Auswirkungen. Dies ähnelt den Beobachtungen anderer Wissenschaftler²⁰⁹. In der kombinatorischen Testung von 293C3-SDIE und Cetuximab bzw. Panitumumab konnten keine über die der gegen EGFR gerichteten Antikörper hinausgehenden Effekte gezeigt werden.

3.4 Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE

Nach der Testung der direkten Effekte wurde die Fähigkeit von NK Zellen, eine Anti-Tumor-Antwort durch 293C3-SDIE gegen KRK-Zelllinien zu induzieren, getestet. Die drei KRK-Zelllinien wurden hierfür in einer Kokultur mit PBMC verschiedener gesunder Spender, die NK Zellen enthalten, und in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE bzw. iso-SDIE für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die NK Zellen (CD56⁺CD3⁻ Lymphozyten) durchflusszytometrisch auf die Expression von CD69, einem frühen Aktivierungsmarker, untersucht.

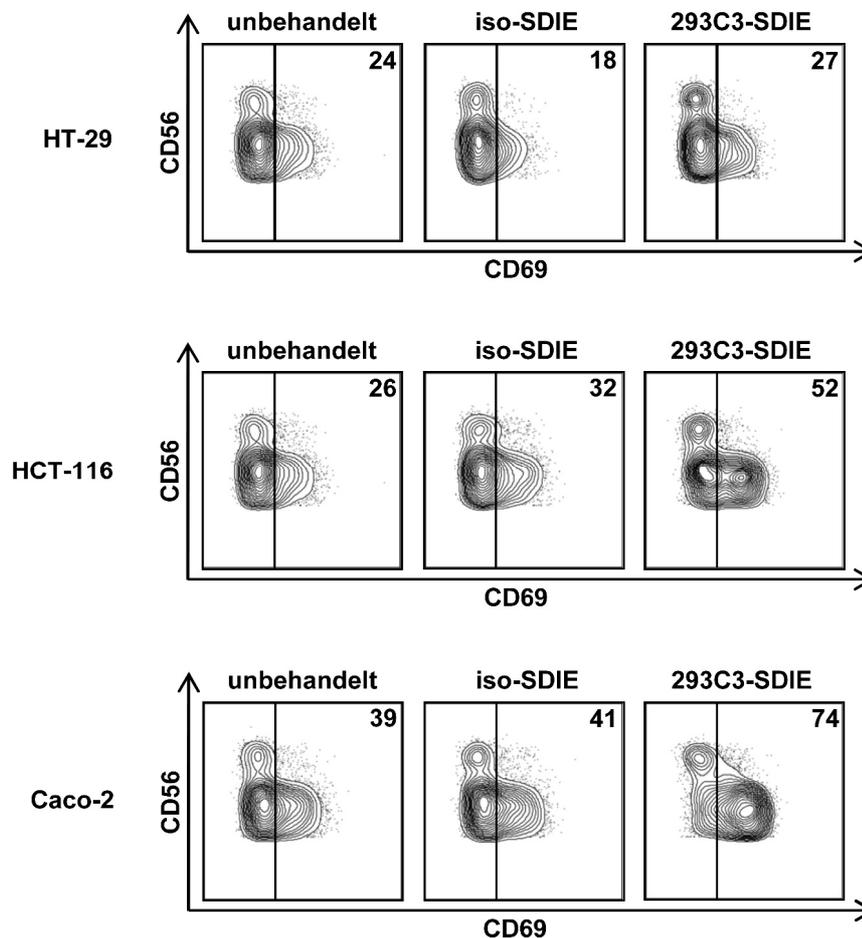


Abbildung 12: Induktion von NK Zell-Aktivität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE. Die drei KRK-Zelllinien Caco-2, HCT-116 und HT-29 wurden mit Zellen eines gesunden PBMC-Spenders im E:T-Verhältnis (effector-to-target) 2,5:1 in An- oder Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 24 h inkubiert. Die Aktivität der NK Zellen (CD56⁺CD3⁻ Lymphozyten) wurde anschließend durch die durchflusszytometrische Messung der CD69 Expression analysiert. Im rechten oberen Quadranten ist jeweils der prozentuale Anteil CD69⁺ NK Zellen gezeigt. Dargestellt sind

exemplarische Daten von insgesamt 5 getesteten PBMC Spendern mit ähnlichen Resultaten.

Es zeigte sich, dass die Expression von CD69 auf NK Zellen nach Inkubation von PBMC mit KRK-Zelllinien in Anwesenheit von 293C3-SDIE im Vergleich zur Isotypkontrolle und zur unbehandelten Probe gesteigert wird.

Wie bereits einleitend erwähnt ist einer der Zytotoxizitätsmechanismen von NK Zellen die Freisetzung der zytotoxischen Proteine Perforin und Granzym, die in präformierten Vesikeln gespeichert werden. Mit dem Nachweis der Expression des Markers CD107a auf NK Zellen kann die Degranulation dieser Vesikel nachgewiesen werden. Analog zum Aktivitätsnachweis durch CD69 wurden die KRK-Zelllinien mit PBMC gesunder Spender und in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE oder iso-SDIE inkubiert.

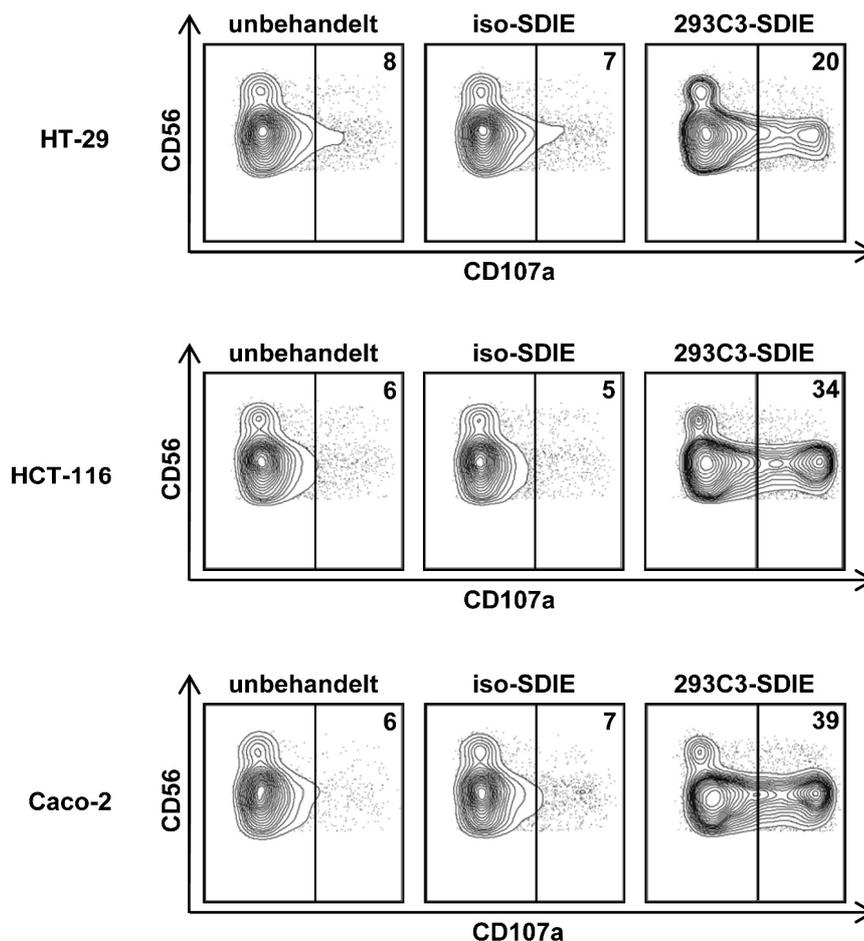


Abbildung 13: Induktion von NK Zell-Degranulation nach 293C3-SDIE Behandlung von KRK-Zelllinien. Die drei KRK-Zelllinien Caco-2, HCT-116 und HT-29 wurden mit Zellen eines gesunden PBMC-Spenders im E:T-Verhältnis 2,5:1 in An- oder

Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 4 h inkubiert. Die Degranulation der NK Zellen (CD56⁺CD3⁻ Lymphozyten) wurde anschließend durch die durchflusszytometrische Messung der CD107a Expression analysiert. Im rechten oberen Quadranten ist jeweils der prozentuale Anteil CD107a⁺ NK Zellen gezeigt. Dargestellt sind exemplarische Daten von insgesamt 5 getesteten PBMC Spendern mit ähnlichen Resultaten.

In der Kokultur von KRK-Zelllinien und PBMC gesunder Spender bewirkte 293C3-SDIE eine erhebliche Induktion der CD107a Expression auf NK Zellen im Vergleich zu der mit iso-SDIE oder unbehandelten Probe.

NK Zellen produzieren neben direkt zytotoxischen Proteinen auch das immunmodulatorische Zytokin IFN-γ. Im Folgenden wurde die Steigerung der Konzentration dieses Zytokins im Zellüberstand nach Inkubation von KRK-Zelllinien mit PBMC gesunder Spender in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE gemessen.

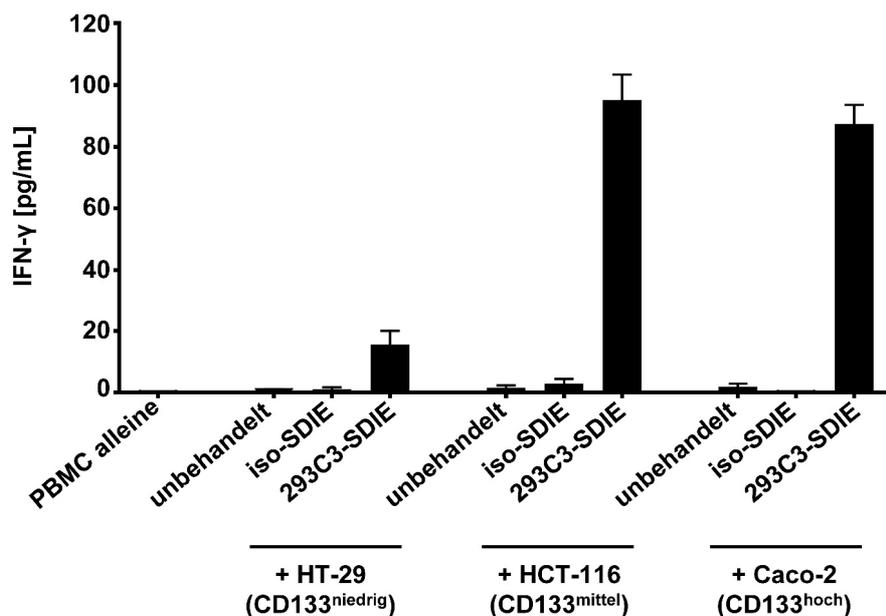


Abbildung 14: Induktion von Interferon-γ Bildung durch 293C3-SDIE. Die drei KRK-Zelllinien Caco-2, HCT-116 und HT-29 wurden mit Zellen eines gesunden PBMC-Spenders im E:T-Verhältnis 2,5:1 in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände mittels ELISA auf IFN-γ getestet. Säulen entsprechen Mittelwerten von Triplikaten mit Standardfehler. Dargestellt sind exemplarische Daten von insgesamt 5 getesteten PBMC Spendern mit ähnlichen Resultaten. Abbildungsvorlage aus ⁸⁴ (exemplarisch gezeigte Daten nicht identisch).

In den Kokulturüberständen konnte mittels ELISA wie erwartet eine erhebliche Induktion der IFN-γ Bildung durch 293C3-SDIE im Vergleich zu iso-SDIE und der

unbehandelten Probe gemessen werden.

3.5 Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen KRK-Zelllinien durch 293C3-SDIE

Ob die nachgewiesene Induktion von NK Zell-Reaktivität auch mit einer messbaren Antikörper-abhängigen Lyse einhergeht, wurde im Folgenden durch Europium-BATDA basierte Zytotoxizitätsansätze untersucht.

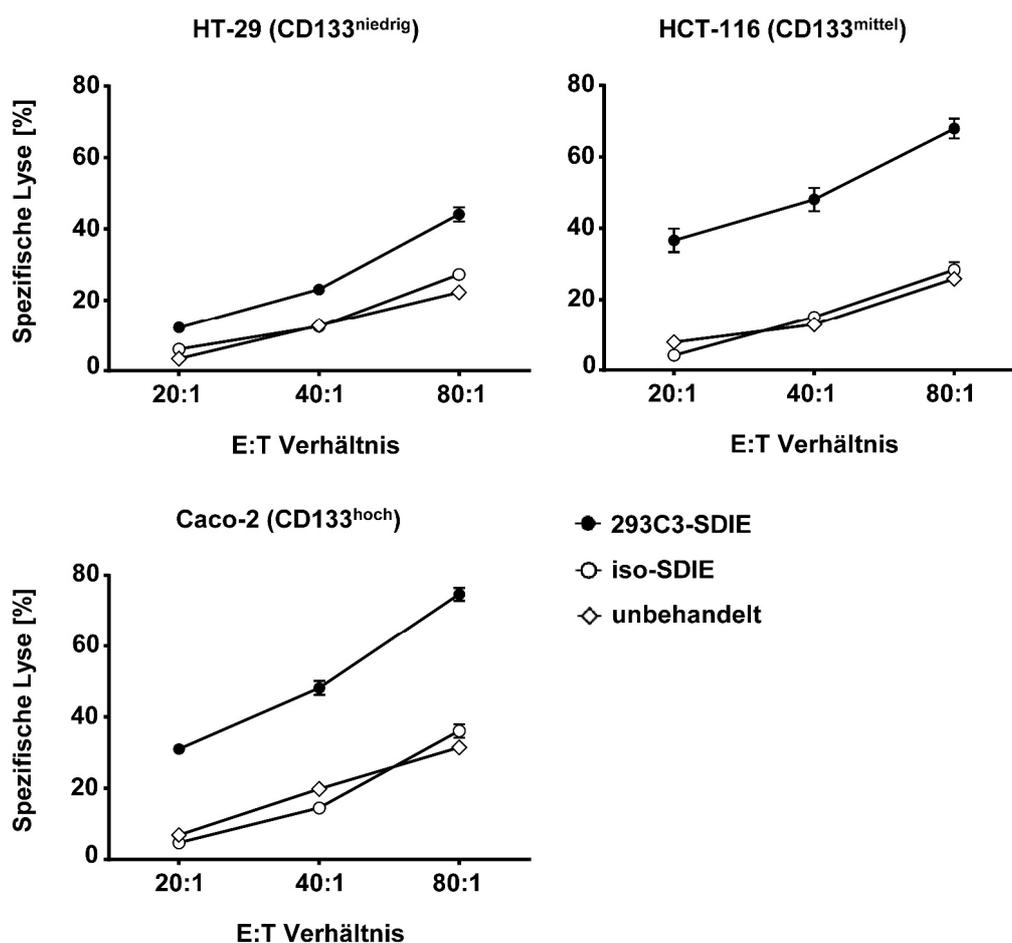


Abbildung 15: Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen KRK-Zelllinien. Die drei KRK-Zelllinien Caco-2, HCT-116 und HT-29 wurden mit Zellen eines gesunden PBMC-Spenders in unterschiedlichen E:T-Verhältnissen in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 2 h inkubiert. Die Zielzellyse wurde durch einen BATDA-Europium basierten Zytotoxizitätsansatz gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten mit Standardfehler eines exemplarischen Experiments von insgesamt 5 getesteten PBMC Spendern mit ähnlichen Resultaten. Abbildung abgewandelt aus ⁸⁴.

293CD-SDIE konnte im Vergleich zu iso-SDIE und der unbehandelten Probe eine

zielzellspezifische Antikörper-abhängige Lyse in allen drei getesteten KRK-Zelllinien induzieren.

3.6 Charakterisierung von 293C3-SDIE auf B-ALL-Zellen

Nach der Testung im KRK sollte 293C3-SDIE auch in der B-ALL getestet werden. Vorab wurde hierzu, analog zur Testung im KRK, auf B-ALL-Zellen überprüft, ob ein relevanter Unterschied hinsichtlich der Bindungseigenschaften der drei murinen anti-humanen CD133 Antikörperklone AC133, 293C3 und W6B3C1 besteht. Hierzu wurde eine vergleichende durchflusszytometrische Analyse auf den zwei B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11, für die in der Literatur eine hohe CD133 Expression beschrieben wurde, sowie primären Leukämiezellen eines B-ALL-Patienten, der in Vorarbeiten bereits eine hohe CD133 Expression gezeigt hatte, durchgeführt ¹⁵⁸.

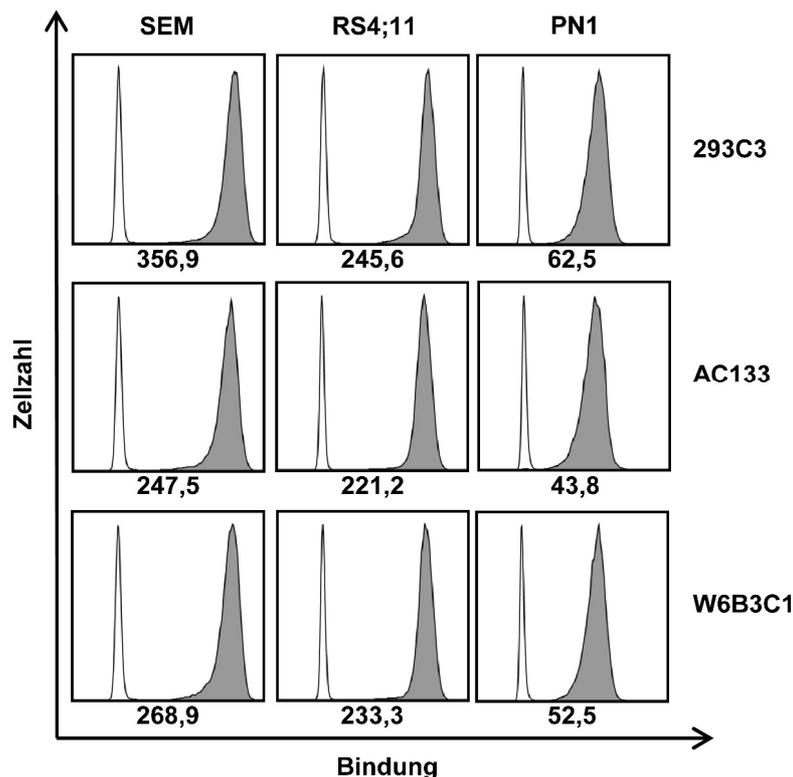


Abbildung 16: Vergleich muriner CD133 Antikörperklone auf B-ALL Zellen.

Die zwei B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 sowie primäre Zellen eines B-ALL-Patienten (PN1) wurden mit je 1 µg/ml der drei murinen CD133 Antikörperklone 293C3, AC133 oder W6B3C1 (ausgefüllte Histogramme) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (1 µg/ml) (leere Histogramme) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Unterhalb der Histogramme ist der jeweilige SFI

gezeigt. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von insgesamt 2 Versuchen mit ähnlichen Resultaten. PN: Patientennummer.

Die Durchflusszytometrie zeigte keine relevanten Unterschiede der Bindungseigenschaften der drei murinen CD133 Antikörper auf den getesteten B-ALL-Zellen. Anschließend wurde eine Dosistitration von 293C3-SDIE auf den B-ALL Zelllinien SEM und RS4;11 sowie primären Leukämiezellen von zwei B-ALL-Patienten (PN1/PN2) ($\geq 96\%$ Blastenanteil) durchgeführt. Dies diente der Bestätigung, dass 1 $\mu\text{g/ml}$ des Antikörpers 293C3-SDIE auch in der B-ALL eine sättigende Konzentration für spätere funktionelle Testungen darstellt.

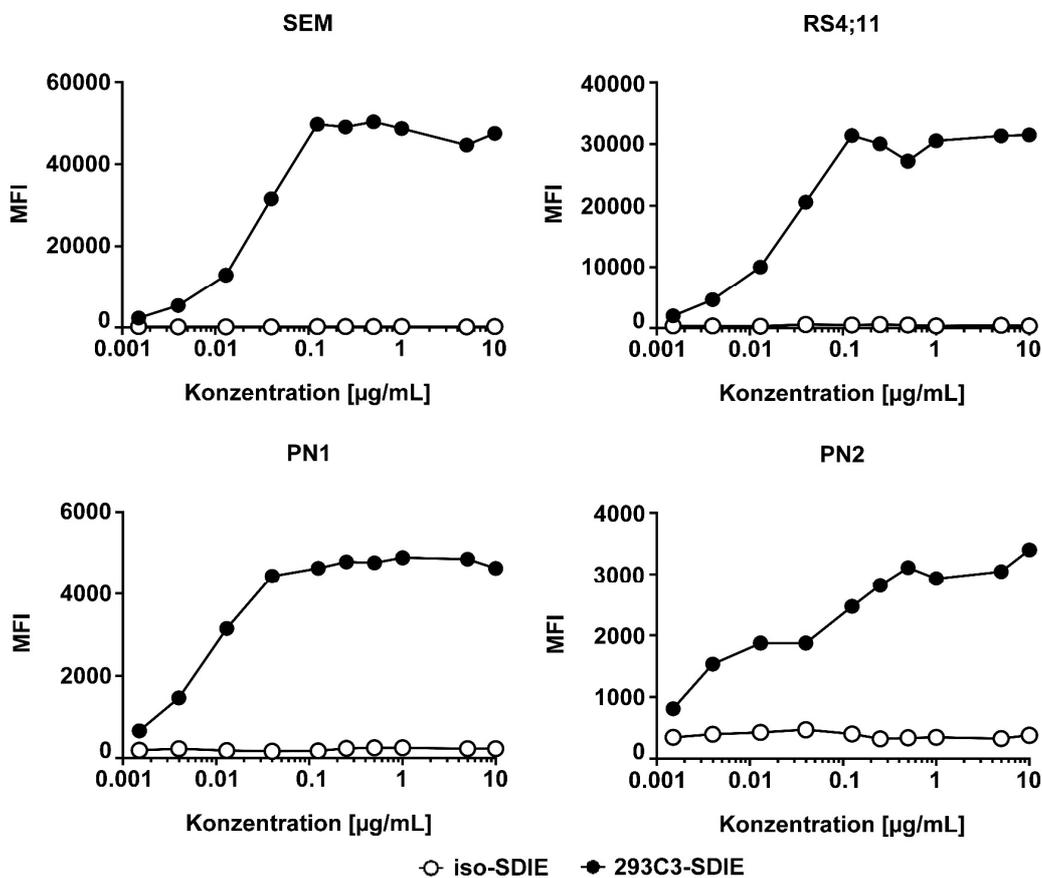


Abbildung 17: Titration des Antikörpers 293C3-SDIE auf B-ALL-Zellen.

Die B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 sowie leukämische Zellen von zwei B-ALL-Patienten (PN1/2) wurden mit ansteigenden Konzentrationen von 293C3-SDIE oder iso-SDIE inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Esel-anti-Human-PE Konjugat gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. PN: Patientennummer. Abbildung abgewandelt aus ¹⁶¹.

Die Durchflusszytometrie bestätigte, dass 1 $\mu\text{g/ml}$ des Antikörpers 293C3-SDIE

ausreichend ist, um eine saturierende Bindung auf der B-ALL-Zelllinie RS4;11 und den Leukämiezellen der zwei getestet B-ALL-Patienten (PN1/2) zu erreichen. Daraus begründet sich die Verwendung von 1 µg/ml als therapeutische Konzentration für die weitere funktionelle Charakterisierung von 293C3-SDIE in der B-ALL.

Um einen Überblick über die CD133 Expression auf B-ALL-Zellen zu erlangen wurden in Vorarbeiten sowie im Zuge dieser Arbeit Leukämiezellen von 27 B-ALL-Patienten durchflusszytometrisch auf die Expression von CD133 analysiert.

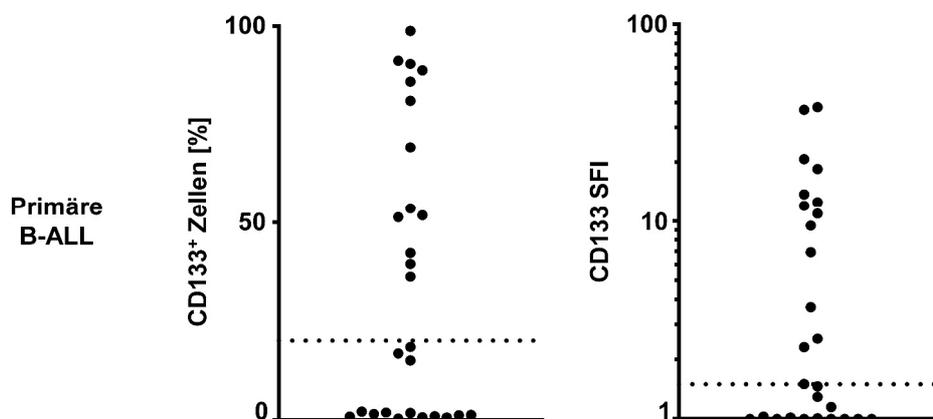


Abbildung 18: Expression von CD133 auf primären B-ALL-Zellen.

Leukämische Zellen von 27 B-ALL-Patienten wurden mit je 10 µg/ml des murinen CD133 Antikörperklon 293C3 oder der entsprechenden Isotypkontrolle (10 µg/ml) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-PE Konjugat gefärbt. Zur Selektion der leukämischen Zellen innerhalb der PBMC Population wurden diese zusätzlich entsprechend ihres Immunphänotyps mit CD10, CD34, CD19 oder CD20 gefärbt und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Querstriche zeigen eine 20% Expression bzw. SFI = 1,5. SFI: spezifischer Fluoreszenzindex. Abbildung abgewandelt aus ¹⁶¹.

Es konnte auf 48% (13 von 27) der getesteten B-ALL-Patienten eine relevante CD133 Expression ($\geq 20\%$ Oberflächenexpression, $SFI \geq 1,5$) festgestellt werden. Zusätzlich wurde in Analysen, die im Zuge dieser Arbeit durchgeführt wurden, untersucht, ob die CD133 Expression der B-ALL-Patienten mit pathophysiologisch oder therapeutisch relevanten Antigenen sowie klinischen Parametern korreliert (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte keine Korrelationen von CD133 mit CD10, CD19, CD20, CD22, CD34 oder BCR-ABL festgestellt werden. Zusätzlich konnte keine Assoziation von CD133 mit dem ALL Risikotyp festgestellt werden, allerdings ein Trend zu verringerten CR-Raten und

verringertem 1-Jahres-Überleben¹⁶¹. Drei MLL-AF4 B-ALL-Patienten zeigten eine sehr hohe CD133 Expression. Die Tabellen 2/3 zeigen die gemessenen CD133 Expressionsdaten sowie weitere klinische Charakteristika der im Weiteren zur funktionellen Testung gewählten B-ALL-Zelllinien und B-ALL-Patienten.

Tabelle 2: Charakteristika der funktionell verwendeten B-ALL-Zelllinien

Zelllinie	Alter ¹	Status ¹	BCR-ABL Status ¹	MLL-AF4 Status ¹	% CD133 ^{+,2}	SFI CD133 ²
RS4;11	32	Rezidiv	-	+	100	90
SEM	5	Rezidiv	-	+	100	230

¹ Biologische Charakteristika entstammen den Zelllinieninformation des DSMZ; ² Werte wurden aus der Abbildung 19 entnommen. BCR: *breakpoint cluster region*; ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*; MLL: *Mixed lineage leukemia*; -: negativ; +: positiv; SFI: spezifischer Fluoreszenzindex.

Tabelle 3: Charakteristika der funktionell verwendeten primären B-ALL-Proben

PN	B-ALL-Form	Alter	Risiko-gruppe	BCR-ABL ¹	MLL-AF4 ¹	WBC [G/L]	Hb [g/dL]	Plt [G/L]	% CD133 ^{+,2}	SFI CD133 ²
1	pro B	63	HR	-	+	39,97	10,1	125	98,8	37,9
2	common	50	VHR	+	-	364,8	8,3	30	88,8	36,7

¹ Ermittelt über PCR oder FISH; ² Werte wurden aus der Abbildung 20 entnommen. PN: Patientenummer; BCR: *breakpoint cluster region*; ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*; MLL: *Mixed lineage leukemia*; -: negativ; +: positiv; HR: hohes Risiko; VHR: sehr hohes Risiko; WBC: *white blood count*; HB: Hämoglobin; Plt: Thrombozyten; SFI: spezifischer Fluoreszenzindex.

3.7 Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen B-ALL-Zelllinien durch 293C3-SDIE

Als nächstes wurde die Fähigkeit von 293C3-SDIE eine Anti-Tumor-Antwort durch NK Zellen gegen B-ALL-Zelllinien zu induzieren, getestet. Die zwei B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 wurden hierfür in einer Kokultur mit PBMC verschiedener gesunder Spender, die NK Zellen enthalten, in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE bzw. iso-SDIE für 24 bzw. 4 h inkubiert.

Anschließend wurden die NK Zellen (CD56⁺CD3⁻ Lymphozyten) durchflusszytometrisch auf die Expression von CD69 und CD107a untersucht.

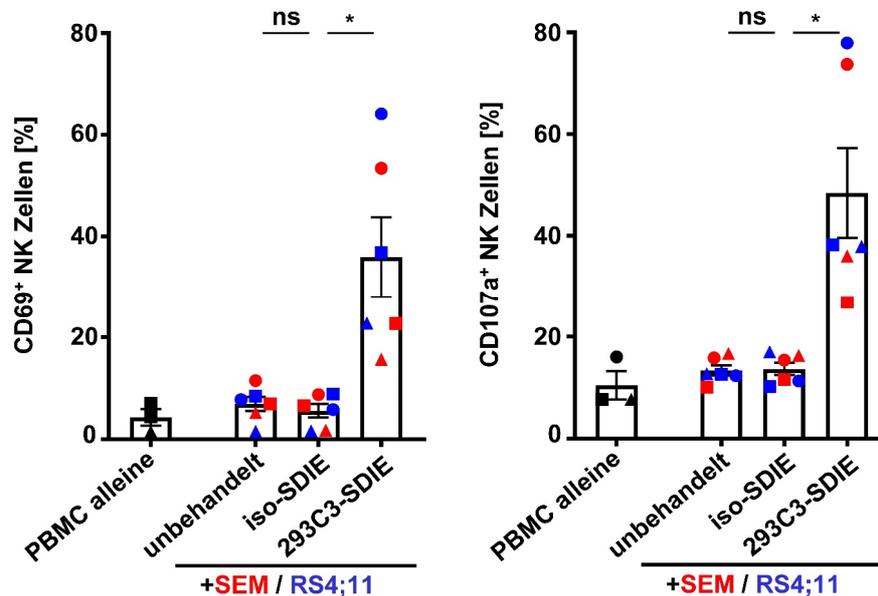


Abbildung 19: Induktion von NK Zell-Reaktivität durch 293C3-SDIE gegen B-ALL-Zelllinien. Die zwei B-ALL-Zelllinien SEM (rot) und RS4;11 (blau) wurden jeweils mit Zellen drei verschiedener gesunder PBMC-Spender (jeweils eigenes Symbol) im E:T-Verhältnis 2,5:1 in An- oder Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 24 h bzw. 4 h inkubiert. Die Aktivität/Degranulation der NK Zellen (CD56⁺CD3⁻ Lymphozyten) wurde anschließend durch die durchflusszytometrische Messung der CD69/CD107a Expression analysiert. Dargestellt sind kombinierte Daten von jeweils drei verschiedenen PBMC-Spendern. Die Balken zeigen den gemittelten Prozentsatz CD69⁺ NK Zellen (links) und CD107a⁺ NK Zellen (rechts). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (n=6). Abbildung abgewandelt aus¹⁶¹.

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass die Expression von CD69 und C107a auf NK Zellen nach Inkubation von PBMC mit B-ALL-Zelllinien in Anwesenheit von 293C3-SDIE im Vergleich zur Isotypkontrolle und zur unbehandelten Probe signifikant gesteigert werden konnte.

3.8 Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen B-ALL-Zelllinien durch 293C3-SDIE

Ob die nachgewiesene Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen B-ALL-Zelllinien auch mit einer messbaren Antikörper-abhängigen Lyse einhergeht, wurde im Folgenden durch Europium-BATDA basierte Zytotoxizitätsansätze untersucht.

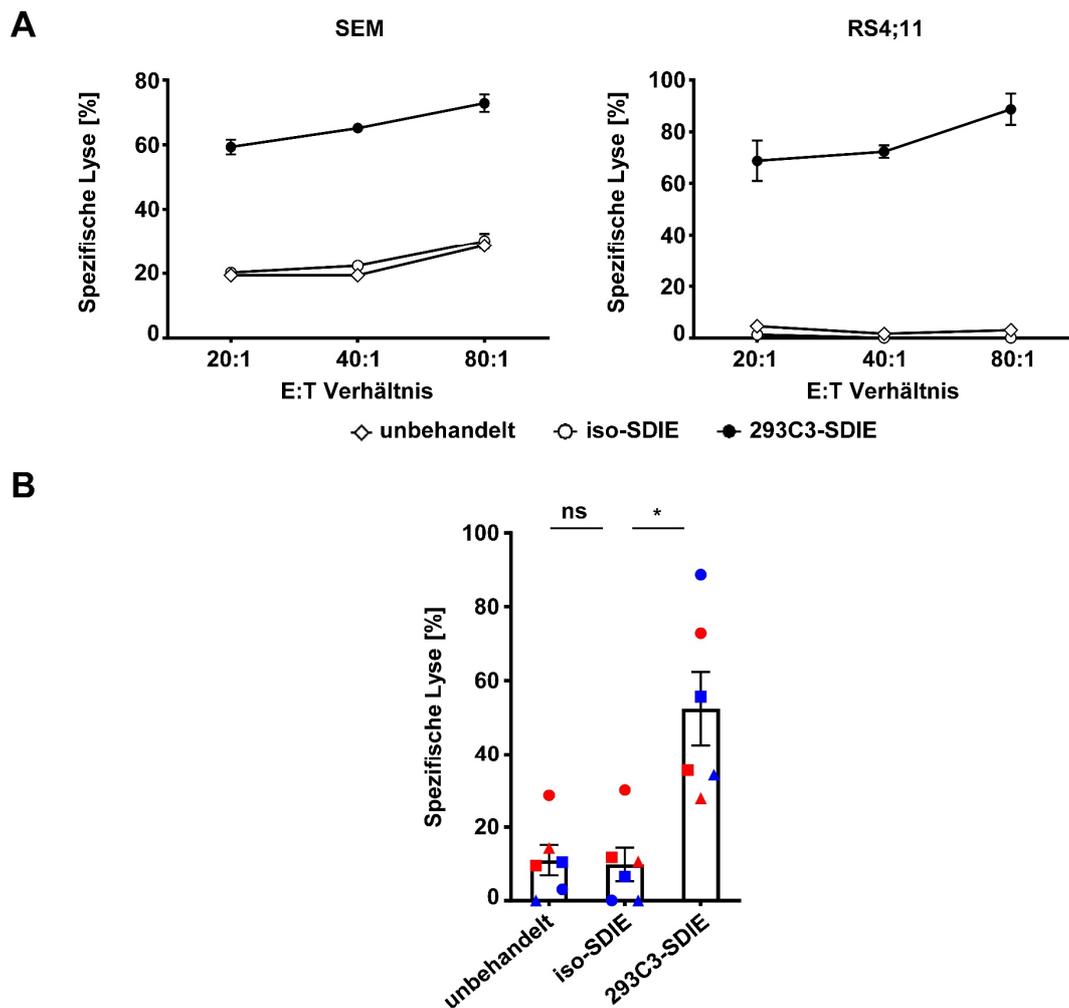


Abbildung 20: Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen B-ALL-Zelllinien. (A/B) Die zwei B-ALL-Zelllinien SEM (rot) und RS4;11 (blau) wurden mit Zellen dreier gesunder PBMC-Spender (jeweils eigenes Symbol) in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 2 h inkubiert. Die Zielzellyse wurde durch einen BATDA-Europium basierten Zytotoxizitätsansatz gemessen. **(A)** Exemplarische Daten der B-ALL-Zelllinien in der Testung mit jeweils einem PBMC-Spender in drei unterschiedlichen E:T-Verhältnissen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. **(B)** Kombinierte Daten der zwei B-ALL-Zelllinien mit jeweils drei getesteten PBMC-Spendern bei einem E:T-Verhältnis von 80:1. Die Balken zeigen den gemittelten Prozentsatz der spezifischen Lyse. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (n=6). Abbildung abgewandelt aus ¹⁶¹.

293C3-SDIE konnte im Vergleich zu iso-SDIE und der unbehandelten Probe eine signifikante zielzellspezifische Antikörper-abhängige Lyse der getesteten B-ALL-Zelllinien induzieren.

3.9 Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen primäre B-ALL-Zellen durch 293C3-SDIE

Abschließend wurde die Fähigkeit von 293C3-SDIE, eine Anti-Tumor-Antwort durch NK Zellen gegen primäre Zellen von B-ALL-Patienten zu induzieren, getestet. Hierfür wurden die primären Zellen von zwei B-ALL-Patienten ($\geq 96\%$ Blastenanteil) jeweils in einer Kokultur mit PBMC drei verschiedener gesunder Spender, die NK Zellen enthalten, in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE bzw. iso-SDIE für 24 bzw. 4 h inkubiert. Anschließend wurden die NK Zellen ($CD56^+CD3^-$ Lymphozyten) durchflusszytometrisch auf die Expression von CD69 und CD107a untersucht.

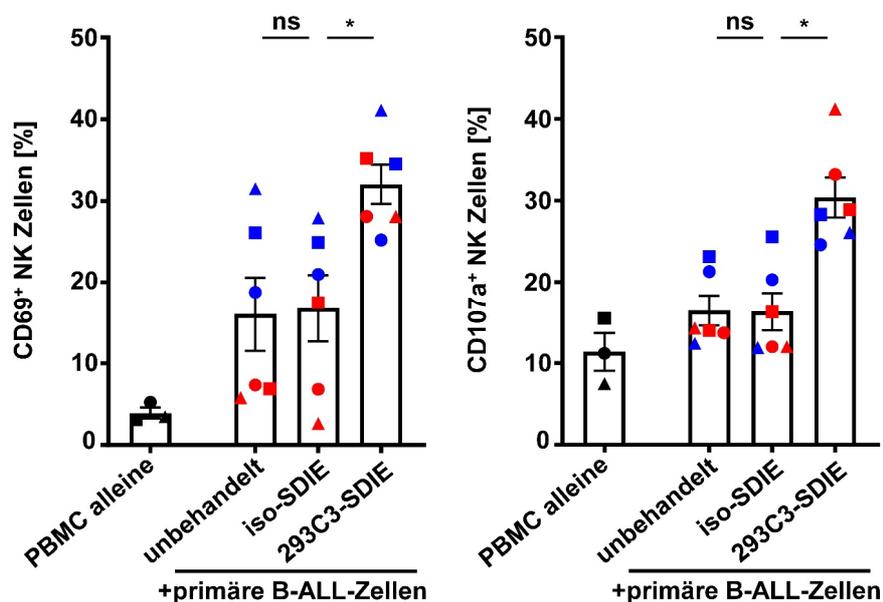


Abbildung 21: Induktion von NK Zell-Reaktivität durch 293C3-SDIE gegen primäre B-ALL-Zellen. Zellen zweier $CD133^+$ B-ALL-Patienten (PN1: rot, PN2: blau) wurden mit Zellen drei verschiedener gesunder PBMC-Spender (jeweils eigenes Symbol) im E:T-Verhältnis 2,5:1 in An- oder Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je $1 \mu\text{g/ml}$) für 24 h bzw. 4 h inkubiert. Die Aktivität/Degranulation der NK Zellen ($CD56^+CD3^-$ Lymphozyten) wurde anschließend durch die durchflusszytometrische Messung der CD69/CD107a Expression analysiert. Dargestellt sind kombinierte Daten von jeweils drei verschiedenen PBMC-Spendern. Die Balken zeigen den gemittelte Prozentsatz $CD69^+$ NK Zellen (links) und $CD107a^+$ NK Zellen (rechts). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Abbildung abgewandelt aus ¹⁶¹

Es zeigte sich, dass 293C3-SDIE eine signifikante Induktion der CD107a und CD69 Expression auf NK Zellen im Vergleich zur iso-SDIE und der unbehandelten Probe bewirkte.

3.10 Induktion von NK Zell-Zytotoxizität gegen primäre B-ALL-Zellen durch 293C3-SDIE

Abschließend wurde getestet, ob auch mit primären Zellen von B-ALL-Patienten eine messbare Antikörper-abhängigen Lyse induziert werden kann.

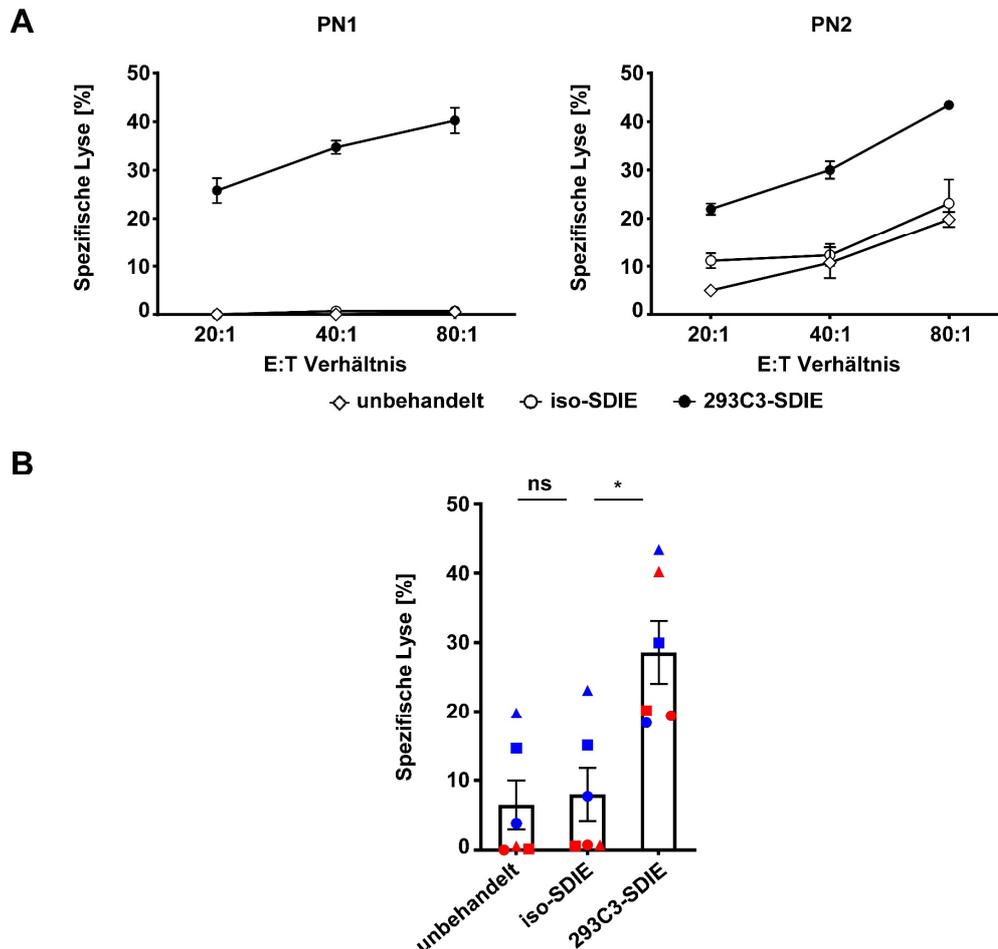


Abbildung 22: Induktion von NK Zell-Zytotoxizität durch 293C3-SDIE gegen primäre B-ALL-Zellen. (A/B) Zellen zweier CD133⁺ B-ALL-Patienten (PN1: rot, PN2: blau) wurden mit Zellen dreier gesunder PBMC-Spender (jeweils eigenes Symbol) in An- bzw. Abwesenheit von 293C3-SDIE und iso-SDIE (je 1 µg/ml) für 2 h inkubiert. Die Zielzelllyse wurde durch einen BATDA-Europium basierten Zytotoxizitätsansatz gemessen. **(A)** Exemplarische Daten der zwei B-ALL-Patienten PN1/2 in der Testung mit jeweils einem PBMC-Spender in drei unterschiedlichen E:T-Verhältnissen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. **(B)** Kombinierte Daten der zwei B-ALL-Patienten mit jeweils drei getesteten PBMC-Spendern bei einem E:T-Verhältnis von 80:1. Die Balken zeigen den gemittelten Prozentsatz der spezifischen Lyse. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (n=6). Abbildung abgewandelt aus ¹⁶¹.

Es zeigte sich auch hier, dass 293CD-SDIE im Vergleich zu iso-SDIE und der unbehandelten Probe eine signifikante zielzellspezifische Antikörper-abhängige

Lyse von primären B-ALL Zellen induzieren kann.

4 Diskussion

Immuntherapeutische Strategien gelten inzwischen als erfolgversprechende Therapieformen zahlreicher maligner Erkrankungen. Speziell der Einsatz monoklonaler Antikörper, wie z. B. Rituximab in der Therapie maligner B-Zell Malignome, hat die Krebstherapie revolutioniert^{84,99}. Trotz essenzieller Erfolge dieser Antitumor-Antikörper ist die therapeutische Effektivität oftmals nicht optimal und wird durch Resistenzen eingeschränkt. Faktoren wie die Mutation von Rezeptoren, alternative Signalwege, genetische Variabilität und die Herunterregulation von Antigenen können die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper beschränken¹¹⁵. Die Optimierung vorhandener Antikörper und Entwicklung neuer Strategien ist deshalb von herausragender Wichtigkeit für die Weiterentwicklung der Tumorthherapie.

Eine mögliche Optimierungsstrategie und essenziell für diese Arbeit ist die Optimierung des Fc-Teils von Antitumor-Antikörpern. Wie sich in Studien mit Rituximab gezeigt hat, spielen NK Zellen und die durch sie vermittelte Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit^{84,103,105,161}. Wichtiger Mediator der ADCC ist der auf NK Zellen vorkommende FcγRIIIa Rezeptor (CD16), der als Bindeglied zwischen Antikörper und NK Zelle fungiert und über den die NK Zell-Aktivierung ausgelöst wird^{84,107,109,161}. Die Fc-Optimierung kann eine Affinitätssteigerung des Fc-Teils zu Fc-Rezeptoren wie FcγRIIIa bewirken und dadurch die ADCC steigern. Zwei grundlegende Strategien werden dabei unterschieden. Einerseits kann durch Änderung des Glykosylierungsmusters des Fc-Teils eine Steigerung der Affinität zu FcγRIIIa erreicht werden. Andererseits kann dies auch durch Änderung der Aminosäuresequenz erzielt werden. Eine bekannte Veränderung der Aminosäuresequenz ist der Austausch der Aminosäuren S239D/I332E (SDIE-Modifikation)^{84,102,118,125,161}. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden bereits erfolgreich mehrere Konstrukte mit SDIE-Modifikation charakterisiert^{2,204,210-214}. Zusätzlich befinden sich zahlreiche SDIE-modifizierte Antikörper in der klinischen Testung und 2020 wurde der SDIE-modifizierte CD19 Antikörper Tafasitamab von der FDA für die Therapie von r/r DLBCL zugelassen^{126,127,161}.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht 293CD-SDIE, ein chimärer und Fc-optimierter CD133 Antikörper, der in früheren Arbeiten durch Körner et al. bereits präklinisch für die Therapie der AML getestet wurde^{2,204}. Da eine CD133 Expression, neben der AML, auch häufig auf der Oberfläche von KRK-Zellen und B-ALL-Zellen vorliegt, postulierten wir, dass ein auf CD133 abzielender Fc-optimierter Antikörper im KRK und in der B-ALL ebenfalls eine vielversprechende immuntherapeutische Strategie darstellen könnte^{176,181}.

Im KRK ist CD133 als unabhängiger negativer prognostischer Marker beschrieben und es gibt Hinweise, dass CD133 an Resistenzen gegen Chemotherapien beteiligt ist^{84,187-190}. In der ALL konnte durch Studien anderer Untersucher gezeigt werden, dass die CD133 Expression mit einer Tendenz zu niedrigeren CR-Raten und einer höheren Inzidenz an Rezidiven und Todesfällen verbunden ist und mit einer höheren Chemotherapieresistenz korreliert ist^{161,195,197}. In dieser Arbeit konnte eine CD133 Expression bei 48% der untersuchten B-ALL Patienten nachgewiesen werden und eine Tendenz zu niedrigeren CR-Raten und eine niedrigere 1-Jahres Überlebensrate in CD133⁺ B-ALL Patienten gezeigt werden¹⁶¹. Zusammengenommen unterstützt dies unsere Annahme, dass CD133 ein vielversprechendes Zielantigen sowohl im KRK als auch in der B-ALL darstellen könnte.

Die Bedeutung einer Entwicklung neuer Therapieoptionen wie 293C3-SDIE im KRK zeigt sich daran, dass die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten im metastasierten Stadium, trotz neuerer Therapieoptionen, aktuell relativ unverändert bei ca. 14% liegt. Dies ist insbesondere deswegen relevant, da trotz umfassender Screeningangebote immer noch ca. 25% der KRK Patienten in diesem Stadium diagnostiziert werden¹³². In der Therapie des KRK werden aktuell neben operativen Methoden, Chemotherapien und Radiotherapie, abhängig von der molekularen Diagnostik und der Lage des Primärtumors, der antiangiogenetische Antikörper Bevacizumab oder die gegen den EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab und Panitumumab eingesetzt^{84,133,138}. Studien zeigten allerdings, dass die Wirksamkeit von Bevacizumab auf wenige Monate beschränkt ist. Dies kann auf Resistenzmechanismen wie die Hochregulation von

VEGFR zurückgeführt werden¹⁴². Darüber hinaus wird die Therapie mit gegen EGFR gerichteten Antikörpern durch KRAS Mutationen (*KRAS* Exon 2-4 und *NRAS* Exon 2-4) beschränkt. Nur ca. 44% der Patienten besitzen keine KRAS Mutationen und kommen für die Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab in Frage^{84,145-147}. Zusätzlich entwickeln sich häufig Resistenzen gegen EGFR-Antikörper, was u. a. auf einen kleinen Anteil an KRAS mutierten Zellen in den meisten KRK zurückzuführen ist, die sich dadurch der Therapie entziehen und Keim eines erneuten Wachstums sind¹⁴⁸. Die in anderen Tumorentitäten erfolgreich eingesetzten CPIs wie Nivolumab, Ipilimumab und Pembrolizumab sind im KRK nur sehr begrenzt einsetzbar. Studien belegen, dass nur Patienten mit einem MSI KRK von der Therapie profitieren. Dies sind ca. 5% der KRK Patienten^{84,150,151}.

Im Vergleich zum metastasierten KRK konnte durch Optimierung der Chemotherapie insbesondere die Heilungsraten der pädiatrischen ALL-Patienten auf ~90% gesteigert werden. Die Heilungsrate adulter ALL-Patienten beträgt jedoch lediglich 30-40%, trotz mehrerer in den letzten Jahren neu zugelassener Therapien^{161,164,165}. So haben Immuntherapeutika wie Blinatumomab, ein bispezifischer CD19xCD3 Antikörper, Inotuzumab Ozogamicin, ein gegen CD22 gerichtetes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat und Tisagenlecleucel, ein anti-CD19 CAR-T-Zelltherapeutikum, zu deutlichen Verbesserungen in der Therapie von r/r B-ALL geführt^{161,167,169,170,215}. Zwar nicht offiziell für die Therapie der ALL zugelassen, aber oft ergänzend sogar in der Erstlinientherapie eingesetzt, ist der Antikörper Rituximab zu erwähnen, der bei CD20⁺ B-ALL-Patienten (ca. 30%) zu signifikant verbesserten Behandlungsergebnissen führt^{161,171}. Neben den immuntherapeutischen Optionen werden auch TKI wie Imatinib, Dasatinib und Ponatinib eingesetzt, welche die Behandlung von BCR-ABL positiven B-ALL-Patienten (ca. 15 - 25%) deutlich verbessert haben^{159,161,216}. Zusätzlich zu den dargestellten Begrenzungen auf Subpopulation hat sich insbesondere für Antigen-abhängige Immuntherapeutika gezeigt, dass eine Antigenmodulation zu Resistenzen führen kann. Dies konnte sowohl für Inotuzumab ozogamicin und Blinatumomab als auch für Tisagenlecleucel als wirksamkeitsbegrenzender Faktor gezeigt werden^{154,161,168,172,217}. Tisagenlecleucel ist aktuell auch nur für

Patienten unter 26 Jahren zugelassen, was u.a. auf die hohen Nebenwirkungsraten und damit verbundenen Risiken zurückzuführen ist²¹⁸. Für CD133 konnte im Zuge dieser Arbeit keine Korrelation mit BCR-ABL, CD19, CD20 und CD22 als etablierten Targets festgestellt werden, was für CD133 als ein neues, vielversprechende Zielantigen in der B-ALL-Therapie spricht¹⁶¹.

Sowohl im KRK als auch in der B-ALL würde 293C3-SDIE, mit der Etablierung eines zusätzlichen Agens, das immuntherapeutische Spektrum erweitern. Speziell im KRK könnte 293C3-SDIE erfolgversprechend sein, da im Gegensatz zu etablierten Therapien nicht das Ziel verfolgt wird, eine Signalweiterleitung in die Tumorzelle durch Blockierung der Rezeptor-Ligand Interaktion zu unterbrechen, und im Gegensatz zu CPIs auch keine hohe Neoantigenlast für die durch NK Zellen vermittelte Wirkung benötigt wird. Für beide Entitäten gilt, dass aufgrund der oftmals geringeren Nebenwirkungen eines monoklonalen Antikörpers gegenüber einer T-Zell basierten Strategie eventuell in Zukunft die wahrscheinlich notwendige Kombination mit weiteren zielzellspezifischen Therapeutika einfacher möglich wäre.

In der Literatur beschrieben und in Vorarbeiten von Körner et al. gezeigt, kann die Bindung verschiedener CD133 Antikörperklone variieren^{181,182,204}. In dieser Arbeit wurden deshalb die drei murinen Antikörperklone AC133, W6B3C1 (CD133/1) sowie 293C3 (CD133/2) vergleichend auf drei KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen getestet. Hierbei konnten in beiden Fällen keine relevanten Bindungsunterschiede festgestellt werden^{84,161}. Dies unterschied sich zur Testung auf AML-Zellen, in welcher der murine CD133 Antikörperklon 293C3 bessere Bindungseigenschaften aufwies²⁰⁴. Der Grund für diesen Unterschied ist bis jetzt ungeklärt, könnte jedoch auf Unterschiede der Epitopregulation zwischen verschiedenen Krebsentitäten hindeuten. So konnten Studien zeigen, dass die Epitope CD133/1 und CD133/2, unter anderem durch Glykosylierung, in Abhängigkeit der Differenzierungsstadien von Krebszellen maskiert werden können¹⁸². Da der CD133 Antikörperklon 293C3 sich auf den drei getesteten KRK-Zelllinien und den B-ALL-Zellen gleichwertig zu den verglichenen Antikörperklonen erwies, wurde, aufbauend auf den Studien zu 293C3-SDIE in

der AML, dieser Klon für die weitere Testung ausgewählt^{84,161}.

In der Produktionsphase konnte 293C3-SDIE mit minimalen Aggregationstendenzen und guter Produktionsausbeute produziert werden⁸⁴. Im Anschluss daran wurde jeweils die Bindungscharakteristik von 293C3-SDIE auf B16F10-CD133/FLT3-Transfektanten, KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen geprüft. Es zeigte sich, dass durch die Chimärisierung/Fc-Optimierung von 293C3-SDIE keine Verschlechterung der Bindungseigenschaften im Vergleich zum murinen 293C3 Antikörper aufgetreten war. Die saturierende Dosis wurde in beiden Entitäten bei ~1 µg/ml ermittelt^{84,161}. Dies entspricht der saturierenden Dosis, die auch durch Körner et al. bei AML Zellen bestimmt worden war²⁰⁴. Im Vergleich dazu benötigen Cetuximab und Panitumumab für eine effektive Verwendung 100-fach höhere Plasmakonzentrationen^{84,219,220}. Die therapeutisch eingesetzten Plasmakonzentrationen für Blinatumomab und Inotuzumab ozogamicin liegen unter 1 µg/ml. Der Vergleich ist allerdings schwierig, da die niedrigere benötigte Konzentration für Blinatumomab u.a. auf ein höheres Effektorpotential der involvierten und im Körper häufiger vorkommenden T-Zellen zurückzuführen ist, dadurch aber auch schneller dosislimitierende Nebenwirkungen wie das *Cytokin-release syndrome* auftreten können²²¹⁻²²³. Auch im Falle von Inotuzumab Ozogamicin ist die Dosis aufgrund von Nebenwirkungen limitiert, die u.a. auf das zytostatische Antibiotikum Ozogamicin zurückzuführen sind²²⁴. In einer aktuellen Phase I Studie des von unserer Arbeitsgruppe entwickelten und mit 293C3-SDIE vergleichbaren FLT3 Antiköper 4G8-SDIEM (FLYSYN) in der Testung gegen AML Zellen zeigten sich Dosen von 45 mg/m² als sicher und tolerabel^{4,225} (NCT02789254). Für eine abschließende Bewertung der notwendigen therapeutischen Konzentration von 293C3-SDIE sind umfassende weitere präklinische und klinische Testungen notwendig.

Wie die Entwicklung der gegen den EGFR gerichteten Antikörper gezeigt hat, können die direkten Effekte von Antikörpern entscheidend zur antitumoralen Wirkung beitragen^{100,101}. In der Literatur gibt es Hinweise, dass CD133 an

Überleben und Proliferation von Tumorzellen, u. a. durch Interaktion mit dem EGFR Signalweg, beteiligt ist^{84,179,185}. In dieser Arbeit konnte zumindest durch 293C3-SDIE, allein und in Kombination mit gegen den EGFR gerichteten Antikörpern, kein Einfluss auf die Proliferation bzw. Viabilität von KRK-Zelllinien festgestellt werden⁸⁴. Allerdings können mit dem gewählten experimentellen System nicht alle direkten Effekte ausgeschlossen werden. So ist es beispielsweise möglich, dass ein noch nicht bekannter Ligand von CD133 im Medium fehlte. Zusätzlich könnte die Zeitspanne und die Konzentration nicht optimal gewählt worden sein. Des Weiteren ist der Einfluss auf Metastasierung und Angiogenese mit dem gewählten Ansatz ebenfalls nicht messbar. Auch die Beurteilung einer möglichen Verstärkung der Wirkung von Chemotherapeutika würde weitere experimentelle Testungen erfordern.

293C3-SDIE konnte in vitro in verschiedenen experimentellen Settings NK Zell-Reaktivität gegen KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen induzieren. Neben der Induktion von NK Zell-Aktivität (CD69) und NK Zell-Degranulation (CD107a) konnte im KRK außerdem die Freisetzung von IFN- γ in den Zellkulturüberstand gezeigt werden^{84,161}. Wie Studien zeigen, ist die Ausschüttung von IFN- γ im KRK, neben klassischen immunologischen Effekten, assoziiert mit einer protektiven Antitumorantwort, die sich u. a. in einer Hemmung der Proliferation zeigt^{226,227}. Zusätzlich konnte eine durch 293C3-SDIE ausgelöste potente Antikörper-abhängige Lyse von drei KRK-Zelllinien, zwei B-ALL-Zelllinien und primären B-ALL-Zellen gezeigt werden^{84,161}. Aufgrund der zuvor gemessenen Induktion von NK Zell-Reaktivität und des gewählten Europium-Ansatzes ist der hier zu Grunde liegende Mechanismus durch NK Zellen vermittelte ADCC. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass 293C3-SDIE auch über andere indirekte Antikörpermechanismen oder andere Immunzellen (u. a. Monozyten, $\gamma\delta$ T-Zellen) wirksam ist. Studien mit anderen Fc-optimierten Antikörpern zeigen, dass diese Antikörper-abhängige Lyse auch über ADCP und CDC auslösen können¹⁰². CDC war in unseren Experimenten aufgrund des Fehlens von Komplementproteinen nicht möglich. Für die Messung von ADCP durch Makrophagen wären durchflusszytometrische Messungen notwendig und

eine Differenzierung von in PBMC enthaltenen Monozyten zu Makrophagen Voraussetzung.

Im Kontext der aktuell verfügbaren Therapieoptionen im KRK ist es essenziell zu erwähnen, dass 293C3-SDIE in der Lage war, die RAS-mutierte KRK-Zelllinie HCT-116 und die Mikrosatelliten-stabilen KRK- Zelllinien Caco-2 und HT-29 zu lysieren. Dies deutet auf eine Effektivität von 293C3-SDIE gegen KRK-Zellen hin, gegen die eine Therapie mit gegen den EGFR gerichteten Antikörpern oder Checkpoint-Inhibitoren bisher keinen Benefit zeigten^{84,228,229}. Im Kontext der aktuell verfügbaren Therapien in der B-ALL war es möglich CD20⁻ und BCR-ABL⁻ B-ALL zu lysieren. Außerdem konnten durch 293C3-SDIE NK Zell Reaktivität insbesondere gegen MLL-AF4 B-ALL Zellen induziert werden. Dies ist eine Subpopulation von B-ALL-Patienten (ca. 5 - 10%), die besonders häufig CD133 exprimiert und bislang mit einer schlechten Prognose verbunden ist^{158,161,162,196}. Die Relevanz von CD133 in MLL-AF4 Leukämien zeigt sich auch daran, dass bereits CAR-T-Zellen für dieses Patientenkollektiv präklinisch entwickelt wurden^{201,230}.

Neben 293C3-SDIE werden derzeit viele weitere immuntherapeutische Strategien mit CD133 als therapeutischem Ziel entwickelt, was für die Relevanz von CD133 als Tumorantigen spricht. So werden bspw. Immuntoxine, CAR-T-Zellen, bi-/tri und tetraspezifische Antikörper, Nanopartikel, Aptamere und Vakzinierungsstrategien mit dendritischen Zellen entwickelt^{84,161,181}. Die in dieser Arbeit entwickelte Antikörper-basierte Strategie zeigt allerdings Vorteile gegenüber alternativen Strategien. In eher künstlichen Konstrukten wie bspw. „*bispecific T cell engager*“ (BiTE), entstehen häufiger Aggregate und sie zeigen oft eine eingeschränkte Proteinstabilität^{84,161}. Dies kann die Produktivität und die Lagerungsmöglichkeiten einschränken. Zusätzlich ist die Halbwertszeit oftmals geringer im Vergleich zu einem herkömmlichen IgG1 Antikörper. Dies kann mit erhöhten benötigten Produktionsmengen und damit höheren Kosten verbunden sein²³¹. Im Gegensatz zur Herstellung von zielzellspezifischen CAR-T-Zellen kann 293C3-SDIE sofort nach der Evaluation der CD133 Expression als Therapie

eingesetzt werden und benötigt keine Vorlaufzeit von ca. 3 Wochen, die man für die Produktion von CAR-T-Zellen benötigt^{84,161}.

Da CD133 u. a. auch auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, könnte 293C3-SDIE potenziell toxisch auf physiologische Zellen wirken. Körner et al. konnten in früheren Studien jedoch zeigen, dass 293C3-SDIE nach Inkubation von CD34⁺ Zellen aus Knochenmarksproben mit NK Zellen keine ADCC gegen CD34⁺ Knochenmarkszellen induziert. Auch auf die Bildung von *Colony forming units* (CFUs) hatte 293C3-SDIE keinen Einfluss. Außerdem konnte in diesen Studien keine CD133 Expression auf Zellen gesunder PBMC Spender gemessen werden^{84,161,204}. Zusätzlich wurden in ersten klinischen Phase I/II Studien mit gegen CD133 gerichteten CAR T-Zellen und mit auf dendritischen Zellen beruhenden Vakzinierungen gegen CD133 bisher keine gravierenden Nebenwirkungen gegen gesunde CD133 exprimierende Zellen beobachtet^{84,161,232-234}. Da der mittlere Altersdurchschnitt von KRK Patienten bei 70-75 Jahren liegt, die B-ALL einen zweiten Häufigkeitsgipfel über 70 aufweist und die Therapie mit hochdosierten Chemotherapeutika in dieser Klientel altersbedingt und aufgrund von Komorbiditäten oft nicht möglich ist, könnte 293C3-SDIE, mit dem aktuell angenommenen Sicherheitsprofil, eine wichtige therapeutische Option für diese Patienten darstellen^{154,156,161}.

Neben der alleinigen Betrachtung der in vitro Effektivität eines Antikörpers, kann die therapeutische Wirksamkeit erst vollständig durch klinische Testungen im Menschen beurteilt werden. Insbesondere für NK Zell basierte Therapien in soliden Tumoren hat sich gezeigt, dass eine niedrige Infiltrationsrate von NK Zellen in den Tumor therapiebegrenzend sein kann^{91,221}. Speziell das Tumormikroenvironment kann durch die Akkumulation suppressiver Faktoren die Rekrutierung von NK Zellen verhindern²¹⁷. Für solide Tumoren und Leukämien ist relevant, dass NK Zellen, im Gegensatz zu T-Zellen, prozentual an der Gesamtanzahl im Blut eine kleine Zellpopulation darstellen. Es hat sich in Studien gezeigt, dass die Anzahl der NK Zellen im Blut oftmals nicht ausreichend ist, um eine manifeste Tumorerkrankung zu eliminieren²³⁵. Für 293C3-SDIE ergeben

sich hieraus ein paar hypothetische Konsequenzen. 293C3-SDIE könnte z. B. in Kombination mit einer herkömmlichen operativen Methode (nur KRK) oder Chemotherapie kombiniert werden, die in der Lage ist, eine hohe Tumormasse zu verringern. Durch 293C3-SDIE könnten dann womöglich insbesondere metastasierende Zellen und Zellen mit Stammzeleigenschaften eliminiert werden. In der B-ALL könnte man 293C3-SDIE nach Erreichen einer MRD (minimal residual disease) Situation einsetzen, ähnlich des Einsatzes von 4G8-SDIEM (FLYSYN) in der AML ^{161,225} (NCT02789254). Zusätzlich könnte man 293C3-SDIE mit CPIs kombinieren. Es hat sich gezeigt, dass CPIs die gegen Checkpoint Rezeptoren wie z. B. TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*) auf NK Zellen wirken, die NK Zell-Reaktivität und damit die ADCC steigern können ^{217,236}. Vorstellbar und aufgrund von Antigenmodulationen zukünftig womöglich auch notwendig wäre die Kombination von 293C3-SDIE mit verschiedenen Immuntherapeutika, um multiple Antigene therapeutisch anzugehen ¹⁶¹.

Zusammenfassend liefert die Arbeit experimentelle Belege dafür, dass 293C3-SDIE eine aussichtsreiche therapeutische Option für Patienten mit KRK und auch B-ALL darstellen könnte. Besonders die Vorteile einer nebenwirkungsärmeren, zielgerichteten Wirkungsweise eines monoklonalen Antikörpers wären sehr geeignet für ältere KRK oder B-ALL-Patienten, bei denen aufgrund von Komorbiditäten eine intensivierete Chemotherapie keine Option darstellt. Eine abschließende Beurteilung von 293C3-SDIE im KRK und in der B-ALL, speziell auch die Klärung der geeigneten Patientengruppe, der Einfluss auf Tumorstammzellen und Metastasierung und mögliche Kombinationen mit anderen Therapeutika, erfordert weitere präklinische Testungen, um daran anschließend eine Evaluation in klinischen Studien zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Trotz umfassender Screeningangebote werden immer noch ca. 25% der Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK) in einem metastasierten Stadium diagnostiziert. Die 5-Jahres Überlebensrate dieser Patienten liegt trotz neuerer Therapieoptionen bei nur ca. 14%. Auch die Heilungsrate von adulten Patienten, die an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankt sind, liegt aktuell bei lediglich ca. 30 - 40%. Aufgrund dessen ist die Entwicklung und Optimierung neuer Therapieansätze für das KRK und die ALL sehr dringlich. Ein Ansatz ist die Entwicklung von Fc-optimierten monoklonalen Antikörpern. Durch Änderung der Aminosäuresequenz des Fc-Teils eines Antikörpers kann die Affinität zu Fc-Rezeptoren wie CD16 auf NK Zellen gesteigert werden. Dadurch verbessern sich Fc-abhängige Effektormechanismen wie die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, die zu den wirksamsten Mechanismen therapeutischer Antikörper gehört. Die Substitution der Aminosäuren S239D/I332E (SDIE-Modifikation) ist eine Möglichkeit der Fc-Optimierung, die bereits in vorausgegangen Arbeiten der Arbeitsgruppe in verschiedenen antikörperbasierten Konstrukten eingesetzt wurde.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Testung des chimären Fc-optimierten CD133 Antikörper 293C3-SDIE mit KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen. Zu Beginn wurden drei verschiedene murine CD133 Antikörperklone auf ihre Bindungseigenschaften auf KRK-Zelllinien und B-ALL-Zellen getestet und in beiden Fällen der Klon 293C3 als optimal definiert. Das auf diesem beruhende Konstrukt 293C3-SDIE konnte mit minimaler Aggregatbildung und guter Ausbeute produziert werden und zeigte keine Veränderung der Bindungsspezifität und -affinität und eine sättigende Konzentration bei $\sim 1 \mu\text{g/ml}$. Während 293C3-SDIE keine direkten Effekte auf das Tumorzellwachstum und die Viabilität von KRK-Zelllinien zeigte, konnte mit drei KRK-Zelllinien, zwei B-ALL-Zelllinien und primären Zellen von B-ALL-Patienten als Zielzellen eine potente NK Zell-Reaktivität (Aktivierung, Degranulation und Interferon- γ Bildung) und Antikörper-abhängige Lyse induziert werden. 293C3-SDIE zeigte diese Effekte auch gegen RAS-mutierte und Mikrosatelliten-stabile KRK-Zellen, gegen

welche eine Therapie mit derzeit verfügbaren, gegen EGFR gerichteten Antikörpern oder Checkpoint-Inhibitoren in bisher abgeschlossenen Studien keinen Benefit erbrachten. In der B-ALL zeigte 293C3-SDIE Effekte gegen CD20⁻ und BCR-ABL⁻ B-ALL-Zellen, gegen die eine Therapie mit Rituximab oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren keine Wirkung zeigt. Zusätzlich konnten Effekte gegen MLL-AF4 B-ALL-Patienten gezeigt werden, eine Subpopulation, die eine hohe CD133 Expression zeigt und mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Zusammenfassend liefert die Arbeit experimentelle Belege dafür, dass 293C3-SDIE eine aussichtsreiche therapeutische Option für Patienten mit KRK und B-ALL darstellen könnte.

6 Publikationen

Schmied BJ *, **Riegg F** *, Zekri L, Grosse-Hovest L, Bühring H-J, Jung G, Salih HR. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer. *Cancers* 2019; 11.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Schmied BJ *, Lutz MS *, **Riegg F**, Zekri L, Heitmann JS, Bühring H-J, Jung G ‡, Salih HR ‡. Induction of NK Cell Reactivity against B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-Optimized FLT3 Antibody. *Cancers* 2019; 11.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

‡ Diese Autoren teilen sich die Seniorautorenschaft.

Riegg F, Lutz MS, Schmied BJ, Heitmann JS, Queudeville M, Lang P, Jung G, Salih HR, Märklin M. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of NK Cell Reactivity against B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*. 2021; 13:1632.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy K WC. *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum; 2018.
2. Koerner S. Ein Fc-optimierter CD133 Antikörper zur Induktion der Immunantwort von natürlichen Killerzellen gegen Leukämiezellen. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen. 2017.
3. Rothfelder K. Die Abwesenheit von NKG2D-Liganden auf leukämieinduzierenden Zellen vereint Stammzeleigenschaften und Immunevasion in der akuten myeloischen Leukämie. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen. 2018.
4. Schmied B. Fc-optimized antibodies for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia and colorectal cancer. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen. 2020.
5. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008; 132:631-644.
6. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125:S3-23.
7. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25:1-3.
8. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11:373-384.
9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124:783-801.
10. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:499-511.
11. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:197-216.
12. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392:245-252.
13. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27:591-619.
14. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983; 302:575-581.
15. La Gruta NL, Gras S, Daley SR, et al. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18:467-478.
16. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:621-663.
17. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:275-308.
18. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:591-619.
19. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, et al. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2011; 12:24-34.
20. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev*

- Immunol. 2005; 5:230-242.
21. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975; 5:112-117.
 22. Kiessling R, Klein E, Pross H, et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 1975; 5:117-121.
 23. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 1975; 16:216-229.
 24. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol.* 2004; 5:996-1002.
 25. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011; 331:44-49.
 26. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16:112-123.
 27. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016; 17:1025-1036.
 28. Lanier LL, Testi R, Bindl J, et al. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989; 169:2233-2238.
 29. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., et al. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol.* 1986; 137:2735-2739.
 30. Michel T, Poli A, Cuapio A, et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *Journal of immunology.* 2016; 196:2923-2931.
 31. Poli A, Michel T, Theresine M, et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology.* 2009; 126:458-465.
 32. Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Michaelsson J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology.* 2016; 16:310-320.
 33. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med.* 2013; 5:208ra145.
 34. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:225-274.
 35. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:329-339.
 36. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990; 11:237-244.
 37. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:217-251.
 38. Ferrone S, Marincola FM. Loss of Hla Class-I Antigens by Melanoma-Cells - Molecular Mechanisms, Functional-Significance and Clinical Relevance. *Immunol Today.* 1995; 16:487-494.
 39. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.*

- 2006; 6:520-531.
40. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:7-19.
 41. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285:727-729.
 42. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005; 436:1186-1190.
 43. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:197-223.
 44. Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 1994; 369:31-37.
 45. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 1994; 265:528-530.
 46. Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 2010; 468:447-451.
 47. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009; 128:7-15.
 48. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017; 8:1124.
 49. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:713-725.
 50. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004; 294:15-22.
 51. Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, et al. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol*. 2001; 167:2068-2073.
 52. Lugini L, Cecchetti S, Huber V, et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol*. 2012; 189:2833-2842.
 53. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, et al. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010; 115:2167-2176.
 54. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909; 5:273-290.
 55. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst*. 1957; 18:769-778.
 56. Old LJ, Boyse EA. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med*. 1964; 15:167-186.
 57. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970; 13:1-27.
 58. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3:991-998.
 59. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu*

- Rev Immunol. 2004; 22:329-360.
60. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331:1565-1570.
 61. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.
 62. Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res*. 1997; 27:95-102.
 63. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016; 39:44-51.
 64. Leone P, Shin EC, Perosa F, et al. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105:1172-1187.
 65. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:252-264.
 66. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957; 147:258-267.
 67. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:361-371.
 68. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2019; 120:6-15.
 69. Romee R, Cooley S, Berrien-Elliott MM, et al. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*. 2018; 131:2515-2527.
 70. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines*. 2019; 4:7.
 71. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, et al. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:219-233.
 72. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2017; 547:222-226.
 73. Bezu L, Kepp O, Cerrato G, et al. Trial watch: Peptide-based vaccines in anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 2018; 7:e1511506.
 74. Lopes A, Vandermeulen G, Preat V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38.
 75. Guedan S, Ruella M, June CH. Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019; 37:145-171.
 76. Shoushtari AN, Wolchok JD, Hellmann M. Principles of cancer immunotherapy. In Atkins MB (Ed), *UptoDate*. 2020. Zugriffen am 12.05.2020.
 77. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*. 2019; 34:45-55.
 78. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell

- therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15:47-62.
79. Zhang C, Wang Z, Yang Z, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA(+) Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther*. 2017; 25:1248-1258.
80. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*. 2018; 9:282.
81. Sur D, Havasi A, Cainap C, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Colorectal Cancer. *J Clin Med*. 2020; 9.
82. Ehrlich P. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. 1900.
83. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, et al. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969; 63:78-85.
84. Schmied BJ, Riegg F, Zekri L, et al. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019; 11.
85. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*. 1970; 132:211-250.
86. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996; 381:751-758.
87. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76:1-22.
88. Kanyavuz A, Marey-Jarossay A, Lacroix-Desmazes S, et al. Breaking the law: unconventional strategies for antibody diversification. *Nat Rev Immunol*. 2019; 19:355-368.
89. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014; 5:520.
90. Tabrizi MA, Tseng C-ML, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discovery Today*. 2006; 11:81-88.
91. Khanna V, Panyam J, Griffith TS. Exploiting antibody biology for the treatment of cancer. *Immunotherapy*. 2020; 12:255-267.
92. Xu Z, Zan H, Pone EJ, et al. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12:517-531.
93. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256:495-497.
94. Sears HF, Atkinson B, Mattis J, et al. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet*. 1982; 1:762-765.
95. Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, et al. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*. 1985; 314:268-270.
96. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988; 332:323-327.
97. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, et al. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12:433-455.

98. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:767-774.
99. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997; 90:2188-2195.
100. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12:278-287.
101. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, et al. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* 2005; 7:301-311.
102. Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:4005-4010.
103. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11:311-331.
104. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology.* 2008; 8:34-47.
105. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol.* 2010; 47:115-123.
106. Koene HR, Kleijer M, Algra J, et al. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997; 90:1109-1114.
107. Wang W, Erbe AK, Hank JA, et al. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015; 6:368.
108. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006; 107:159-166.
109. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008; 9:495-502.
110. Saunders KO. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Front Immunol.* 2019; 10:1296.
111. Jefferis R, Lund J, Pound JD. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunological Reviews.* 1998; 163:59-76.
112. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Scientific Reports.* 2016; 6.
113. Richards JO, Karki S, Lazar GA, et al. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:2517-2527.
114. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4027-4035.
115. Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. *Biologics.* 2019; 13:33-51.
116. Carter PJ, Lazar GA. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17:197-223.
117. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. Fc optimization of therapeutic

- antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating fc gamma receptors. *Cancer Research*. 2007; 67:8882-8890.
118. Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, et al. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2017; 44:327-336.
 119. Nose M, Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80:6632-6636.
 120. Shields RL, Lai J, Keck R, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002; 277:26733-26740.
 121. Zahavi D, AlDeghaither D, O'Connell A, et al. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy. *Antibody Therapeutics*. 2018; 1:7-12.
 122. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*. 2018; 9:47-62.
 123. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009; 8:226-234.
 124. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001; 276:6591-6604.
 125. Moore GL, Chen H, Karki S, et al. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010; 2:181-189.
 126. Liu R, Oldham RJ, Teal E, et al. Fc-Engineering for Modulated Effector Functions-Improving Antibodies for Cancer Treatment. *Antibodies (Basel)*. 2020; 9.
 127. Salles G, Duell J, Gonzalez Barca E, et al. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2020; 21:978-988.
 128. Bruhns P, Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. 2015; 268:25-51.
 129. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. In Goldberg RM, Seres D (Ed), *UpToDate*. 2020. Zugegriffen am 12.05.2020.
 130. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:394-424.
 131. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019; 13:109-131.
 132. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020.
 133. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019; 394:1467-1480.
 134. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells.

- Nature. 2016; 529:298-306.
135. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017; 23:1124-1134.
 136. Macrae FA, Bendell J. Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer. In Tanabe KK (Ed), *UpToDate*. 2020. Zugegriffen am 12.05.2020.
 137. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*. 2012; 23:2479-2516.
 138. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27:1386-1422.
 139. Verdaguer H, Tabernero J, Macarulla T. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2016; 8:230-242.
 140. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*. 2016; 388:518-529.
 141. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350:2335-2342.
 142. Van der Jeught K, Xu HC, Li YJ, et al. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018; 24:3834-3848.
 143. Jakobovits A, Amado RG, Yang X, et al. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 2007; 25:1134-1143.
 144. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357:2040-2048.
 145. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012; 486:532-536.
 146. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369:1023-1034.
 147. Peeters M, Kafatos G, Taylor A, et al. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer*. 2015; 51:1704-1713.
 148. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012; 486:537-540.
 149. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol*. 2017; 28:1713-1729.
 150. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16:361-375.
 151. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis

- of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:5322-5330.
152. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013; 381:303-312.
 153. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2019; 381:1632-1643.
 154. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2020; 395:1146-1162.
 155. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016; 127:2391-2405.
 156. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl).* 2005; 14:53-62.
 157. Advani AS, Aster JC. Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of B cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. In Larson RA, Rosmarin AG (Ed), *UpToDate.* 2021. Zugegriffen am 28.01.2021.
 158. Godfrey L, Crump NT, O'Byrne S, et al. H3K79me2/3 controls enhancer-promoter interactions and activation of the pan-cancer stem cell marker PROM1/CD133 in MLL-AF4 leukemia cells. *Leukemia.* 2020.
 159. Hefazi M, Litzow MR. Recent advances in the biology and treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Lymphat Cancer.* 2018; 8:47-61.
 160. Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr.* 2017; 5:4.
 161. Riegg F, Lutz MS, Schmied BJ, et al. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of NK Cell Reactivity against B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers.* 2021; 13:1632.
 162. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 2002; 30:41-47.
 163. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995; 9:1783-1786.
 164. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017; 7:e577.
 165. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine.* 2015; 373:1541-1552.
 166. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344:1038-1042.
 167. Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy

- for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2017; 376:836-847.
168. Wynne J, Wright D, Stock W. Inotuzumab: from preclinical development to success in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* 2019; 3:96-104.
169. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 375:740-753.
170. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018; 378:439-448.
171. Maury S, Chevret S, Thomas X, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 375:1044-1053.
172. Kellner C, Peipp M, Gramatzki M, et al. Perspectives of Fc engineered antibodies in CD19 targeting immunotherapies in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncoimmunology.* 2018; 7:e1448331.
173. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019; 16:372-385.
174. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, et al. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:12425-12430.
175. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997; 90:5002-5012.
176. Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target.* 2019; 27:257-269.
177. Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol.* 2013; 229:355-378.
178. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432:396-401.
179. Jang JW, Song Y, Kim SH, et al. Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life Sci.* 2017; 184:25-29.
180. Corbeil D, Karbanova J, Fargeas CA, et al. Prominin-1 (CD133): Molecular and Cellular Features Across Species. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 777:3-24.
181. Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med.* 2018; 7:18.
182. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, et al. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* 2010; 70:719-729.
183. Fargeas CA, Huttner WB, Corbeil D. Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update. *Tissue Antigens.* 2007; 69:602-606.
184. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, et al. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood.* 2004; 103:2055-2061.
185. Weng CC, Kuo KK, Su HT, et al. Pancreatic Tumor Progression Associated With

- CD133 Overexpression: Involvement of Increased TERT Expression and Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Akt Activation. *Pancreas*. 2016; 45:443-457.
186. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7:493-507.
 187. Eingabe von PROM1. The human protein atlas. Verfügbar auf: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007062-PROM1/pathology>. Zugegriffen am 25.04.2019.
 188. Chen S, Song X, Chen Z, et al. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8:e56380.
 189. Huang R, Mo D, Wu J, et al. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies. 2018; 97:e10446.
 190. Ong CW, Kim LG, Kong HH, et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2010; 23:450-457.
 191. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445:106-110.
 192. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008; 118:2111-2120.
 193. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445:111-115.
 194. Abbasian M, Mousavi E, Arab-Bafrani Z, et al. The most reliable surface marker for the identification of colorectal cancer stem-like cells: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2019; 234:8192-8202.
 195. Tolba FM, Foda ME, Kamal HM, et al. Expression of CD133 in acute leukemia. *Med Oncol*. 2013; 30:527.
 196. Wuchter C, Ratei R, Spahn G, et al. Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping. *Haematologica*. 2001; 86:154-161.
 197. Tae Lee S, Ho Jang J, Hong Min Y, et al. AC133 antigen as a prognostic factor in acute leukemia. *Leukemia Research*. 2001; 25:757-767.
 198. Elgendi HM, Mekawy MA, Abdel Wahab SE, et al. AC133 expression in egyptian children with acute leukemia: impact on treatment response and disease outcome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010; 32:286-293.
 199. Cox CV, Diamanti P, Evely RS, et al. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood*. 2009; 113:3287-3296.
 200. Mak AB, Nixon AM, Moffat J. The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription. *Cancer Res*. 2012; 72:1929-1934.
 201. Li D, Hu Y, Jin Z, et al. TanCAR T cells targeting CD19 and CD133 efficiently eliminate MLL leukemic cells. *Leukemia*. 2018; 32:2012-2016.
 202. Ebinger S, Ozdemir EZ, Ziegenhain C, et al. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016; 30:849-862.

203. le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell*. 2008; 14:47-58.
204. Koerner SP, Andre MC, Leibold JS, et al. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017; 31:459-469.
205. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017; 47:946-953.
206. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001; 25:402-408.
207. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013; 2:e71.
208. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer*. 2017; 16:116.
209. Song N, Liu S, Zhang J, et al. Cetuximab-induced MET activation acts as a novel resistance mechanism in colon cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:5838-5851.
210. Hofmann M, Grosse-Hovest L, Nubling T, et al. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012.
211. Schmiedel BJ, Werner A, Steinbacher J, et al. Generation and Preclinical Characterization of a Fc-optimized GITR-Ig Fusion Protein for Induction of NK Cell Reactivity Against Leukemia. *Mol Ther*. 2013.
212. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, et al. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res*. 2013; 73:683-694.
213. Steinbacher J, Baltz-Ghahremanpour K, Schmiedel BJ, et al. An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer*. 2015; 136:1073-1084.
214. Raab S, Steinbacher J, Schmiedel BJ, et al. Fc-Optimized NKG2D-Fc Constructs Induce NK Cell Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Breast Cancer Cells Independently of HER2/neu Expression Status. *Journal of Immunology*. 2014; 193:4261-4272.
215. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, et al. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13:25-40.
216. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol*. 2017; 35:394-401.
217. Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, et al. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2020; 12.
218. O'Leary MC, Lu X, Huang Y, et al. FDA Approval Summary: Tisagenlecleucel for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2019; 25:1142-1146.
219. Erbitux. European Medicine Agency. Verfügbar auf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_de.pdf. Zugegriffen am 03.05.2019.

220. Vectibix. European Medicine Agency. Verfügbar auf: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vectibix-epar-product-information_de.pdf. Zugegriffen am 03.05.2019.
221. Bald T, Krummel MF, Smyth MJ, et al. The NK cell-cancer cycle: advances and new challenges in NK cell-based immunotherapies. *Nat Immunol.* 2020; 21:835-847.
222. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014; 124:188-195.
223. Maude SL, Barrett D, Teachey DT, et al. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J.* 2014; 20:119-122.
224. Kebriaei P, Cutler C, de Lima M, et al. Management of important adverse events associated with inotuzumab ozogamicin: expert panel review. *Bone Marrow Transplant.* 2018; 53:449-456.
225. Heitmann JS, Dörfel D, Kayser S, et al. First-in-Human Phase I Dose Escalation and Expansion Study Evaluating the Fc Optimized FLT3 Antibody Flysyn in Acute Myeloid Leukemia Patients with Minimal Residual Disease. *Blood.* 2020; 136:8-9.
226. Wang L, Wang Y, Song Z, et al. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J Interferon Cytokine Res.* 2015; 35:273-280.
227. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, et al. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2016; 6:96.
228. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359:1757-1765.
229. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015; 372:2509-2520.
230. Bueno C, Velasco-Hernandez T, Gutierrez-Aguera F, et al. CD133-directed CAR T-cells for MLL leukemia: on-target, off-tumor myeloablative toxicity. *Leukemia.* 2019; 33:2090-2125.
231. Wang Q, Chen Y, Park J, et al. Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies (Basel).* 2019; 8.
232. Rudnick JD, Fink KL, Landolfi JC, et al. Immunological targeting of CD133 in recurrent glioblastoma: A multi-center phase I translational and clinical study of autologous CD133 dendritic cell immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology.* 2017; 35:2059-2059.
233. Wang Y, Chen M, Wu Z, et al. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial. *Oncoimmunology.* 2018; 7:e1440169.
234. Dai H, Tong C, Shi D, et al. Efficacy and biomarker analysis of CD133-directed CAR T cells in advanced hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase II trial. *Oncoimmunology.* 2020; 9:1846926.
235. Salih HR HM, Grosse-Hovest L, Nuebling T, Bamberg M, Aulwurm S, et al. Elimination Of Minimal Residual Disease (MRD) In AML Patients With a Novel Fc-Optimized FLT3 Antibody (4G8-SDIEM). *Blood.* 2013; 122.
236. Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents

- NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018; 19:723-732.
237. Brand A, Allen L, Altman M, et al. Beyond authorship: attribution, contribution, collaboration, and credit. *Learned Publishing.* 2015; 28:151-155.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung „Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie“ des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) am Partnerstandort Medizinischen Klinik Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Helmut R. Salih und Betreuung durch Bastian Schmied (KRK-Teil) durchgeführt.

Sämtliche gezeigte Versuche außer der nachfolgend aufgeführten wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Daten der nachfolgend aufgelisteten Abbildungen und Tabellen wurden nicht ausschließlich von mir selbst erhoben:

Abbildung 19: Expression von CD133 auf primären B-ALL-Zellen

Tabelle 3: Charakteristika der funktionell verwendeten primären B-ALL-Proben

Der Großteil der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind in bereits veröffentlichte Publikation eingeflossen. Der Beitrag von weiteren Co-Autoren an den Publikationen ist im Folgenden im Sinne der *CRedit contribution taxonomy guidelines*²³⁷ dargestellt:

Schmied BJ *, **Riegg F** *, Zekri L, Grosse-Hovest L, Bühring H-J, Jung G, Salih HR. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer. *Cancers* 2019; 11.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Conceptualization: Salih HR, Schmied BJ

Project administration: Schmied BJ

Supervision: Salih HR

Methodology: Schmied BJ, Riegg F, Zekri L, Grosse-Hovest L, Bühring H-J

Investigation: Riegg F, Schmied BJ

Formal analysis: Schmied BJ, Riegg F

Validation: Salih HR, Schmied BJ, Riegg F

Data curation: Schmied BJ, Riegg F

Visualization: Schmied BJ, Riegg F

Writing—original draft preparation: Schmied BJ

Writing—review and editing: Salih HR, Jung G

Resources: Salih HR, Grosse-Hovest L, Bühring H-J, Zekri L, Jung G

Funding acquisition: Salih HR

Riegg F, Lutz MS, Schmied BJ, Heitmann JS, Queudeville M, Lang P, Jung G, Salih HR, Märklin M. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of NK Cell Reactivity against B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*. 2021; 13:1632.

Conceptualization: Salih HR, Riegg F, Märklin M

Project administration: Riegg F

Supervision: Salih HR, Märklin M

Methodology: Riegg F, Lutz MS, Schmied BJ

Investigation: Riegg F, Lutz MS

Formal analysis: Riegg F, Märklin M

Validation: Salih HR, Riegg F, Märklin M, Heitmann JS

Data curation: Riegg F, Märklin M

Visualization: Riegg F, Märklin M

Writing—original draft preparation: Riegg F, Märklin M

Writing—review and editing: Salih HR, Jung G

Resources: Salih HR, Jung G, Queudeville M, Lang P

Funding acquisition: Salih HR, Märklin M

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

Tübingen, den

9 Danksagung

An Herrn Prof. Dr. Helmut R. Salih

für das Ermöglichen dieser Arbeit. Danke, dass Sie mir zu diesem intensiven, lehrreichen und interessanten Einblick in die Wissenschaft verholfen haben und vielen Dank auch für die herausragende fachliche und persönliche Betreuung.

An Bastian

für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit und die vielen gemeinsamen Stunden die wir an unseren gemeinsamen Projekten verbracht haben. Du hast meinen Horizont fachlich und persönlich erweitert.

An das IZKF Kolleg und speziell Frau Monterro

für die fachliche und finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit und die kontinuierliche Weiterbildung die mich sehr voran gebracht haben.

An meine Eltern,

die mich in der gesamten Zeit unterstützt haben und immer an mich glauben.

An meine Freunde speziell die Hometown Group und die Simed Bang,

die immer ein offenes Ohr hatten und mir immer wieder erholsame Auszeiten beschert haben.

An Netti

die mich bedingungslos unterstützt hat und immer an meiner Seite ist.