Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik IV Klinik der Ludwig-Maximilian-Universität München Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Fcγ-Rezeptor-IIIA-gentechnisch modifizierte T-Zellen in Kombination mit EGFR-spezifischen Antikörpern zur Lyse von Kolonkarzinomzellen *in vitro*

> Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> > vorgelegt von Scarlet Luisa Berdin aus Hamburg 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Andreas Humpe
mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Sebastian Kobold
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	30.09.2021

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung1			
	1.1	Immuntherapie von Tumoren			
	1.1.1	Antikörper in der Tumortherapie1	I		
	1.1.2	Adoptive T-Zell-Therapie	2		
	1.2	Immuntherapie des kolorektalen Karzinoms	ł		
	1.3	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität6	3		
	1.4	Polymorphismen des FcγRIIIa-Rezeptors	7		
	1.5	T-Zellen im Kolonkarzinom)		
	1.6	Fragestellung)		
2	Mate	rial	2		
	2.1	Ausstattung und Geräte	2		
	2.2	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	2		
	2.3	Materialen, Reagenzien und Medien für die Zellkultur	3		
	2.3.1	Materialien und Reagenzien	3		
	2.3.2	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien13	3		
	2.3.3	Medien zur Zellkultur und Puffer14	ł		
	2.4	Antikörper15	5		
	2.5	T-Zelllinien und Verpackungszellinien15	5		
	2.6	Zelllinien des humanen kolorektalen Karzinoms15	5		
	2.7	Enzyme	5		
	2.8	Oligonukleotide	3		
	2.9	Vektoren und Inserts	3		
	2.10	Kits und Assays	3		
	2.11	Software			
3	Meth	oden	7		
	3.1	Molekularbiologische Methoden	7		
	3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)17	7		
	3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren17	7		
	3.1.3	Gelelektrophorese	7		
	3.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten18	3		
	3.1.5	Restriktionsverdau18	3		
	3.1.6	Sequenzierung von DNA-Fragmenten18	3		
	3.1.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	3		
	3.1.8	Transformation und Plasmidamplifikation19)		
	3.2	Allgemeine Zellkultur)		
	3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen19)		

0	Deel	(cogung	66		
8	Abkürzungen				
7	Liter	aturverzeichnis	. 47		
6	Zusa	nmenfassung	. 46		
	5.5	Anwendung von FcγRIIIa-(CAR-)T-Zellen beim Kolonkarzinom	. 44		
	5.4	FcγRIIIa-CAR-T-Zellen	. 42		
	zerstöre	en	. 39		
	5.3	FcyRIIIa-T-Zellen können kolorektale Karzinomzellen trotz aktivierender Mutationen			
5.2 Einfluss der FcyRIIIa-Rezeptorpolymorphismen auf die Bindeaffinität zu Cetuximal		Einfluss der FcyRIIIa-Rezeptorpolymorphismen auf die Bindeaffinität zu Cetuximab	. 37		
	5.1	Der Mutationsstatus bestimmt die Sensitivität von Kolonkrebszelllinien auf Cetuximab.	. 36		
5	Disk	ussion	. 36		
	4.6	Expression des FcyRIIIa auf primären humanen T-Zellen	. 35		
	Tumorz	elllinien	. 33		
	4.5	Feststellung von Tumorzelllyse in Kokulturen von FcyRIIIa T-Zellen und kolorektalen			
	4.4	Untersuchung der Bindungskapazität der FcyRIIIa-Polymorphismen zu Cetuximab	. 31		
	4.3.2	Nachweis der Expression des FcγRIIIa Rezeptors in humanen T-Zellen	. 29		
	4.3.1	Nachweis der Expression des FcγRIIIa auf murinen T-Zellen	. 29		
4.3 Expression des FcyRIIIa auf T-Zelllinien		Expression des FcyRIIIa auf T-Zelllinien	. 29		
	4.2	Klonierung der retroviralen Expressionsvektoren für FcyRIIIa	. 26		
•	4.1	Direkte Effekte von Cetuximab auf Kolorektal-Karzinom-Zelllinien	. 25		
4	Erae	bnisse	. 25		
	3.5	Statistische Analyse	. 24		
	3.4.4	Detektion von Antikörper-Bindung	. 23		
	3.4.3	Oberflächenfärbung	. 23		
	3.4.2	Durchflusszytometrie	. 23		
	3.4.1	- Magnetic-activated cell sorting (MACS)	. 23		
	3.4	Immunologische Methoden	. 23		
	3.3.3	Retrovirale Transduktion von primären humanen T-Zellen	. 22		
	3.3.2	Retrovirale Transduktion von T-Zelllinien	21		
	3.5	Herstellung eines Retrovirus durch Transfektion einer Vernackungszellinie	20		
	3.2.0	Potrovirale T Zell Transduktion	. 20		
	3.2.4		. 20		
	3.2.3	Viabilitatsversuche	. 19		
	3.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	. 19		
			40		

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie von Tumoren

Die Rolle von Immunität in der Krebsentstehung wurde erstmals 1909 von Paul Ehrlich vermutet, der annahm, dass das Immunsystem das Wachstum von Karzinomen unterdrücken kann (Dunn et al. 2002). 50 Jahre später beschrieben Frank Macfarlane Burnet und Lewis Thomas das Konzept der Immunüberwachung als die Fähigkeit des Immunsystems, Tumore zu kontrollieren (Dunn et al. 2002, Pernot et al. 2014). Gleichzeitig haben Tumore Mechanismen entwickelt, um der Immunüberwachung zu entgehen. Der Selektionsdruck, den das Immunsystem auf Tumorzellen ausübt, führt zum Auftreten resistenter Tumorzellklone und zur klinischen Progression von Tumoren (Pernot et al. 2014). Auch wenn Tumore mittels Chemotherapie wirksam zurückgedrängt werden können, ist diese aggressive Therapie für den Patienten mit vielen Nebenwirkungen verbunden. Strategien, welche sich die ureigene Eigenschaft des Immunsystems entartete Zellen zu erkennen zu Nutzen machen, werden intensiv erforscht. Die Immuntherapie von Tumorerkrankungen umfasst mittlerweile ein Feld, welches in den zwei letzten Jahrzehnten bedeutende Erfolge erreichen konnte (Rosenberg 2012). Neben der Chirurgie und der Strahlen- und Chemotherapie ist die Immuntherapie zum vierten Pfeiler der onkologischen Therapie geworden.

1.1.1 Antikörper in der Tumortherapie

Besonders die Administration von monoklonalen Antikörpern (mAk), die eine tumorspezifische und individuelle Therapie ermöglichen, ist hier erfolgreich (Adams et al. 2005, Weiner et al. 2010). Die Entwicklung der Hybridomtechnologie ermöglichte es, Antikörper gegen definierte tumorassoziierte-Antigene (TAA) auf der Tumorzelloberfläche herzustellen, die eine zielgenaue und spezifische Therapie des Tumors ermöglichen (Kohler et al. 1975). Die spezifische Antigenbindungsstelle eines Antikörpers wird durch die intervariablen Domänen der leichten und schweren IgG-Ketten an der Fab-Domäne der IgG-Leichtketten gebildet (scFv, *single chain variable fragment*), die im Zuge der B-Zelldifferenzierung erreicht werden. Durch Herstellung chimärer und humanisierter Antikörper wurde die Immunogenität der größtenteils durch Mausproteine gebildeten Moleküle überwunden (Chames et al. 2009).

Mehrere Antikörper sind im klinischen Gebrauch und ein fester Bestandteil der pharmakologischen Tumortherapie. Die meisten von ihnen binden an die Oberfläche von Tumorzellen und interferieren mit der Aktivierung von Signalwegen, die für das Tumorwachstum und Überleben wichtig sind. Dabei richten sie sich vorzugsweise gegen Antigene, die durch Tumorzellen überexprimiert oder nur von dieser gebildet werden (Adams et al. 2005). Zunehmend werden aber auch inhibierende Rezeptoren auf T-Zellen therapeutisch angesteuert (Hodi et al. 2010, Topalian et al. 2012).

Der zweite, mittlerweile als für die Effektivität der Therapie zentral anerkannte Wirkmechanismus von Antikörpern ist immunologisch. Durch ihre konstante Fc-Domäne können Antikörper das zelluläre Immunsystem und das Komplementsystem zur Bekämpfung der Zielzelle rekrutieren (Clynes 2006).

Allerdings ist die Anwendbarkeit einer solchen passiven Immuntherapie mit Antikörpern auch begrenzt. Die beobachtete Lebensverlängerung ist meist nur temporär (Chames et al. 2009). Einer der Gründe hierfür ist, dass Tumorzellen genetisch instabil sind (Sjoblom et al. 2006) und Varianten, die das Antigen verloren haben, selektiert werden (Restifo et al. 2012, Restifo et al. 1993, Restifo et al. 1996, Schreiber et al. 2011). Mutationen im Signalweg können zu einer unkontrollierten Aktivierung von Signalrezeptoren führen und die Antikörperwirkung aufheben. Zudem limitiert die unzureichende Gewebspenetration die Wirkung von Antikörpern. Während im lymphoiden Neoplasien beeindruckende Erfolge gesehen wurden, ist die Verteilung von Antikörpern im Gewebe solider Tumore oft ungenügend und ihre Wirkung dadurch reduziert (Caruana et al. 2014, Riethmuller et al. 1994). Der niedrige Blutfluss, eine hohe Zelldichte und der fehlende Lymphabfluss führen zu einem hohen interstitiellen Druck, welcher die Passage von Makromolekülen wie Antikörpern erschwert (Jain 1990). Dazu bewirken endotheliale und epitheliale Barrieren dass nur ein geringer Teil des infundierten Antikörpers an den Tumor gelangt (Christiansen et al. 2004).

1.1.2 Adoptive T-Zell-Therapie

Um Tumore effektiver anzugreifen zu können wird daher zunehmend versucht, die bereits in der Mikroumgebung des Tumors vorhandenen Zellen gegen diesen auszurichten. Unter den Immunzellen besitzen insbesondere CD8+ zytotoxische T-Zellen das lytisch-toxische Arsenal um Tumorzellen zu zerstören, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems und CD4-T-Zellen sind an der komplexen Immunreaktion beteiligt (Spitzer et al. 2017). Der große klinische Erfolg von Antikörpern gegen T-Zell-inhibierende Rezeptoren wie PD-1und CTLA-4, die das natürliche Bremssystem des Immunsystems hemmen, lieferten den Beweis, dass das Immunsystem gegen Tumore mit T-Zellen reagieren kann (Hodi et al. 2010, Lipson et al. 2013). Im Gegensatz zu Antikörpern haben T-Zellen die Fähigkeit zu extravasieren und in das Gewebe einzuwandern (Caruana et al. 2014, Masopust et al. 2013, Slaney et al. 2014) indem sie einem Chemokingradienten folgen und mithilfe proteolytischer Enzyme die extrazelluläre Matrix auflockern. Damit Antigene für den T-Zellrezeptor (TCR) erkennbar werden, müssen sie jedoch prozessiert und durch major histocompatibility complex (MHC) - beschränkte Peptidantigene (pMHC) präsentiert werden (Goldrath et al. 1999). Durch eine veränderte Prozessierung von Antigenpeptiden und die Herabregulierung der MHC-Präsentation können Tumore so der Immunerkennung entkommen (Schreiber et al. 2011). Ein weiteres Hindernis für die Erzeugung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort ist, dass natürlich vorkommende TCR zu

schwach an tumorassoziierte Antigene binden, um die zytotoxische T-Zelle zu aktivieren. Um T-Zellen dennoch gegen den Tumor eines Patienten zu lenken zu können, wurden Strategien zum autologen Transfer von tumorspezifischen T-Zellen entwickelt. Erste, langandauernde anti-tumorale Immunreaktionen wurden nach Infusion patienteneigener, *ex vivo* amplifizierter Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom beobachtet (Dudley et al. 2002, Rosenberg et al. 1990). Die Gewinnung der TIL ist allerdings schwierig und Erfolge sind bisher auf das maligne Melanom limitiert. Die TCR-Therapie, bei der T-Zellen mit einem spezifischen TCR passend zu dem angezielten TAA ausgestattet werden, hat ebenfalls Erfolge gezeigt (Morgan et al. 2006). Wie auch bei normalen T-Zellen ist die Erkennung von tumorassoziierten Antigenen über TCR-T-Zellen aber MHC-beschränkt, sodass diese genetisch mit dem *human leukocyte antigen*-(HLA)-Immunphänotyp des Patienten übereinstimmen müssen. Der hohe Aufwand für jeden einzelnen Patienten begrenzt die Anwendbarkeit dieser Therapie.

Aktuell ist zusammen mit der Checkpoint-Inhibition, die adoptive Zelltherapie (ACT) mit T-Zellen, die mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) umgeleitet werden, die wohl attraktivste Strategie der Immuntherapie. CARs besitzen als chimäre Transmembranmoleküle eine duale Funktion. Zum einen erkennen sie Tumorantigene auf der Oberfläche von Tumorzellen, zum anderen aktivieren sie die lytische Maschinerie der T-Zelle über intrazelluläre Signaldomänen. Durch diesen neuartigen Aktivierungsmechanismus können CAR-T-Zellen die Immuntoleranz von Tumorzellen und die Limitierung von HLA-Übereinstimmung umgehen (D'Aloia et al. 2018). Eshhar und Kollegen zeigten als erste, dass die Verlinkung der Antigen-erkennenden variablen Domäne eines bestimmten Antikörpers mit der signalübermittelnden ζ -Kette des TCR-Komplexes (oder seltener der γ -Kette des FcɛRl γ) T-Zellen mit der für Antikörper typischen Spezifität ausstattet und ihre Funktionen so gegen den Tumor lenkt (Eshhar et al. 1993).

Als beobachtet wurde, dass ein einzelnes Signal nicht ausreicht, um langanhaltende T-Zellgesteuerte Immunantworten zu unterhalten, begann man, assoziierte kostimulatorischen Moleküle der TCR Signaldomäne wie 4-1BB und CD28 an die zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren einzuschleusen. Diese intensivieren die Signalvermittlung und unterhalten eine stärkere antitumorale Antwort durch Proliferation und Lebensverlängerung der T-Zelle (Brentjens et al. 2013). Der Durchbruch der CAR-T-Zell-Therapie wurde in ihrer Anwendung gegen B-Zellhämatologische Malignitäten erreicht. Die Behandlung mit anti-CD19 CAR-T-Zellen hat bei Kindern und Erwachsenen mit Rückfall einer akuten B-Zell-Leukämie (B-ALL), einer chronischlymphatischen Leukämie oder eines B-Zell non-Hodgkin-Lymphoms nahezu komplette Remissionen in verschiedenen Trials erreicht (Maude et al. 2014, Wang et al. 2017). Anti-CD19-CAR-T-Zellen wurden daraufhin als Letztlinientherapie für Patienten bis zu 25 Jahren mit B-ALL und für Erwachsene mit bestimmten Typen von großzelligem B-Zelllymphom zugelassen (D'Aloia et al. 2018).

1.2 Immuntherapie des kolorektalen Karzinoms

Trotz des Fortschrittes in der Prävention und Früherkennung ist das kolorektale Karzinom (KRK) noch immer der dritthäufigste Tumor bei Männern (10 % aller Tumoren) und der zweithäufigste Tumor bei Frauen weltweit (9 % aller Tumoren) (Ferlay et al. 2015). Es ist der zweithäufigste Grund von Tumormortalität in Europa und ist weltweit für 8,5% von Krebstodesfällen verantwortlich (Ferlay et al. 2013). Derzeit beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit KRK um 65 % (Ferlay et al. 2010). Annäherungsweise ein Viertel der Patienten befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem metastasierten Stadium, wobei das mediane Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (mKRK) weniger als 2 Jahre beträgt (Siegel et al. 2014). Die Kombination von Irinotecan und Oxaliplatin mit Fluorouracil oder Folat (FOLFIRI oder FOLFOX) hat die mediane Überlebenszeit in diesem Stadium auf 20 bis 24 Monaten verlängert und kommt als Erstlinientherapie bei Patienten mit mKRK zum Einsatz (Douillard et al. 2003, Schuch et al. 2009, Tournigand et al. 2004).

Trotz der Effektivität der zytostatischen oder zytotxischen Chemotherapie wird ihr Kombinierungspotential jedoch durch eine steigende Toxizität reduziert. Außerdem limitieren intrinsische oder erworbene Chemotherapieresistenzen ihr kuratives Potential (Ellebaek et al. 2012). Die Entdeckung neuer molekularer Angriffsziele im Tumorgewebe hat zur Zulassung neuer spezifischer biologischer Therapeutika zur Therapie des Kolonkarzinoms geführt. So konnte der anti-epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) - Antikörper Cetuximab (Erbitux®) in das Therapieregime von Chemotherapie-resistenten Tumoren mit aufgenommen werden. Als Immunglobulin G1 (IgG1) monoklonaler Antikörper bindet Cetuximab an die extrazelluläre Domäne von EGFR und verhindert kompetitiv die Rezeptoraktivierung durch die Liganden EGF, TGF- α und Amphiregulin (Baselga 2001). Der transmembrane Tyrosinkinaserezeptor EGFR ist auf allen normalen Epithelien exprimiert und in bestimmten Tumoren überexprimiert. Cetuximab ist in der Lage, diese Signalaktivierung zu blockieren, die unkontrollierte Proliferation des Tumors zu stoppen und Apoptose zu induzieren (Ciardiello et al. 2008).

Die Therapie mit EGFR-gezielten Antikörpern hat Effektivität in der Erstlinien- und Zweitlinientherapie des mKRK in der Kombination mit Irinotecan oder Oxaliplatin bewiesen. (Bokemeyer et al. 2009, Saltz et al. 2007, Van Cutsem et al. 2009, Van Cutsem et al. 2011) und eine Tumorreduktion bei Patienten erzielt, deren Tumoren unter Irinotecan-Behandlung weiterhin im Progress waren (Cunningham et al. 2004, Saltz et al. 2007). Trotz des Erfolges durch die zusätzliche Therapie mit Cetuximab zeigt der Antikörper jedoch bis dato nur Wirkung bei 10 bis 20 % der Patienten (Bokemeyer et al. 2009, Cunningham et al. 2004). Eine steigende Anzahl von Daten aus Studien zu Patienten mit Chemotherapie-refraktären mKRK, die Cetuximab als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie erhielten, zeigen, dass das klinische Ansprechen auf Cetuximab bei Patienten erreicht werden kann, deren Tumoren keine Mutationen in Codon 12 und 13 auf Exon 2 des KRAS-Genes tragen (De Roock et al. 2008, Di Fiore et al. 2007, Karapetis et al. 2008, Lievre et al. 2008). Weniger als die Hälfte der Patienten, deren Tumor einen KRAS-Wildtyp (wt) aufweist, profitieren von der Behandlung mit Cetuximab, was zusätzliche Resistenzmechanismen wahrscheinlich macht (Benvenuti et al. 2007, De Roock et al. 2008, Di Fiore et al. 2007, Karapetis et al. 2008, Lievre et al. 2008). Mutationen im BRAF-Gen, einem weiteren *Downstream*-Effektor des EGFR-Signalweges, können ebenso die Sensibilität auf Cetuximab beeinflussen. Sie scheinen sich gegenseitig mit der KRAS-Mutation auszuschließen und werden als prädiktive Faktoren für KRAS-wt-Fälle angesehen (Di Nicolantonio et al. 2008).



Abbildung 1: Schematische Darstellung des EGFR-Signalweges. Nach Bindung der Liganden EGF, TGF und Epiregulin/Amphiregulin werden zwei zentrale Signalwege ausgelöst, der RAS-RAF-MAPK-Kinaseweg und PI3K-PTEN-AKT-Signalweg. Bekannte Mutationen des RAS-, B-RAF-, PI3K-Proteins sowie die Inaktivierung des regulierenden PTEN führen zur konstitutiven Aktivierung des Signalweges und ungesteuerter Proliferation der Tumorzellen. Schema modifiziert nach Schuch, Kobold, Bokemeyer (Schuch et al. 2009).

Derzeit ist die Behandlung mit Cetuximab nur beim RAS-Wildtyp, EGFR-exprimierendem metastatischen Kolorektalkarzinom in Kombination mit dem Chemotherapie-Regime FOLFIRI (Irinotecan, 5-Fluorouracil (5-FU), Leucovorin) zur Erstlinientherapie sowie in Kombination mit Irinotecan bei gegenüber der Irinotecan-basierten Chemotherapie refraktären Patienten zugelassen (Bokemeyer et al. 2009, Cunningham et al. 2004, Van Cutsem et al. 2009). Die europäische Arzneimittelkommission empfiehlt den Einsatz von Cetuximab ausschließlich bei mKRK-Patienten mit dem KRAS-Wildtyp-Gen, was bis zu 65 % aller mKRK-Patienten mit einschließt (Van Cutsem et al. 2009).

Eine zunehmende Evidenz belegt jedoch, dass eine anti-EGFR-gerichtete Antikörpertherapie im kolorektalen Karzinom trotz aktivierender Mutationen im EGFR-Signalweg in der Lage ist, therapeutisch wirksam zu sein. So konnte gezeigt werden, dass ein u.a. von NK-Zellen und Makrophagen getragener Immunglobulinrezeptor, der FcyRIIIa, mit einem Valin/Valin(V/V) -Polymorphismus an Position 158 mit einem Erfolg der Cetuximab-Therapie beim kolorektalen Karzinom korreliert, ungeachtet des KRAS-Status (Bibeau et al. 2009). Weiterhin konnte eine präklinische Arbeit belegen, dass ein Cetuximab-basierter, bispezifischer Antikörper durch eine T-Zell-Aktivierung in der Lage ist, auch KRAS-mutierte Zelllinien in vitro und in vivo zu lysieren (Schlaeth et al. 2010). Diese Beobachtungen legen nahe, dass neben der Signalwegblockade durch Cetuximab weitere Mechanismen existieren, die zur Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems führen und zu einer Tumorlyse führen können. Unabhängig von ihrem genetischen Status zu Beginn der Therapie entwickeln Patienten mit mKRK eine Resistenz gegen Cetuximab (Diaz et al. 2012, Misale et al. 2012). Außerdem existieren weitere Mutationen, die trotz KRAS-Wildtyp den Erfolg einer Cetuximab Therapie unwahrscheinlich machen. Es wird also dringend nach Möglichkeiten gesucht, weitere Patientengruppen einer Therapie mit Cetuximab zugänglich zu machen (Fakih 2015).

1.3 Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität

Monoklonale Antikörper sind wirksam gegen Tumore und haben ein Nebenwirkungsspektrum, welches sich signifikant von denen konventioneller Chemo- und Radiotherapie unterscheidet (Houot et al. 2011). Die Wirksamkeit der Antikörper wurde lange Zeit hauptsächlich auf die Blockade aktivierender Signalwege zurückgeführt. Dies ist zum Beispiel der Fall für die EGFR- und HER2-Rezeptorblocker Cetuximab und Trastuzumab. So wurde beobachtet, dass die Blockade der Signaltransduktion in der Tumorzelle nicht der einzige Wirkmechanismus ist, der die klinischen Erfolge dieser Antikörpertherapien bei Tumorpatienten erklärt (Ferris et al. 2010). Eine zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass die entscheidende anti-tumorale Wirksamkeit der Antikörpertherapie ein Mechanismus ist, der Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) genannt wird (Weiner et al. 2010).

ADCC beschreibt die zytotoxischen Effekte angeborener Immunzellen, die durch Interaktion mit Antikörper-gebundenen Tumorzellen ausgelöst werden. Antikörper binden mit ihrem F_{ab}-Teil Antigene auf Tumorzellen und rekrutieren und aktivieren durch ihren F_c-Teil Immuneffektorzellen über Fcγ-Rezeptoren (FcγR). Dadurch kommt es zur Ausschüttung von zytotoxischen Granula, die eine zielgerichtete Zytotoxizität gegen den Tumor hervorrufen (Kohrt et al. 2012, Nimmerjahn et al. 2008). Zwar wird ADCC klassischerweise durch NK-Zellen beobachtet, jedoch exprimieren auch Makrophagen und dendritische Zellen FcγR-Rezeptoren und können ADCC vermitteln (Clemenceau et al. 2006, Hirvinen et al. 2013). Dass Fc-Rezeptor-abhängige Mechanismen entscheidend für die Wirksamkeit von mAb sind wurde sowohl in präklinischen als auch in

klinischen Studien deutlich (Houot et al. 2011). Unter Behandlung mit dem anti-CD20 mAb Rituximab, dem anti-HER2 mAb Trastuzumab und dem anti-EGFR mAb Cetuximab haben Träger bestimmter hochaffiner FcyRIIIa-Rezeptorpolymorphismen ein besseres Therapieansprechen (Bibeau et al. 2009, Cartron et al. 2002, Musolino et al. 2008, Weng et al. 2003). Die Stärke der ADCC scheint also die Wirkung von Antikörpertherapien zu entscheiden und eine Strategie zur Verbesserung der anti-tumoralen Wirksamkeit mit mAb wäre damit die Erhöhung der ADCC. Dies könnte insbesondere beim Kolonkarzinom vielversprechend sein, da die Wirksamkeit von Cetuximab dort durch Mutationen im Signalweg verhindert wird. Die genauere Untersuchung des ADCC und der Antikörper, die es vermitteln, sowie die Entwicklung von Antikörpern, die so konzipiert sind, dass sie FcyRIIIa verstärkt aktivieren, sind somit von besonderem Interesse (Schlaeth et al. 2010, Shields et al. 2001).

1.4 Polymorphismen des FcyRIIIa-Rezeptors

Als Rezeptoren für Antigen-Immunkomplexe stellen Fc-Rezeptoren eine wichtige Verbindung zwischen dem humoralen und dem angeborenen zellulärem Effektorsystem her (Nimmerjahn et al. 2008). Die Gruppe der Immunglobulin G Fragment C Rezeptoren kann in drei Klassen unterteilt werden, den FcyRI (CD64), FcyRII (CD32 a, b, c) und FcyRIII (CD16 a, b), die sich in ihrer Struktur und Zelldistribution sowie in ihrer Affinität und Spezifität zu den verschiedenen IgG-Subtypen unterscheiden (Ferris et al. 2010). Viele Immunzellen exprimieren verschiedene Fcy-Rezeptoren, die zu Effektorantworten wie oxidativem Burst, Phagozytose und Zytokinfreisetzung, ADCC und Antikörper -abhängiger zellulärer Phagozytose (ADCP) führen können, je nachdem welche Zelle und welcher Rezeptor aktiviert wird (Nimmerjahn et al. 2008, Takai 2002). Den aktivierenden FcyRIIa und FcyRIIIa-Rezeptoren wurde die wichtigste Rolle in der Vermittlung von ADCC zugeschrieben (Mellor et al. 2013). Als sogenannte niedrig-affine Fcy-Rezeptoren können sie kein lösliches, aber dafür multimeres, aggregiertes Immunglobulin, das an Antigene gebunden ist, effektiv erkennen (Nimmerjahn et al. 2008). Beide tragen funktionale Polymorphismen, die ihre Affinität für das F_c Fragment von IgG beeinflussen. FcyRIIIa codiert für einen transmembranen Rezeptor, der auf Makrophagen, Monozyten, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und selten auf T-Zelluntergruppen exprimiert wird (Lanier et al. 1985). NK-Zellen tragen nur FcyRIIIa, weshalb sie wiederholt als zentrale Zellgruppe für das ADCC herausgestellt wurden (Clynes 2006, Nimmerjahn et al. 2008).

Der FcγRIIIa besteht aus zwei extrazellulären IgG-ähnlichen Domänen (D1 und D2), einer Transmembrandomäne, und einem kurzen intrazellulären Segment (Hibbs et al. 1994, Tamm et al. 1996). IgG bindet als Immunkomplex über die zweite, proximale IgG-ähnliche Domäne (D2) und löst die Signaltransduktion durch Phosphorylierung von Immunrezeptor-Tyrosin-basierten

Aktivierungsmotiven (Nakadate et al. 2014) auf assoziierten $F_{c\gamma}$ - oder die CD3ζ-Untereinheiten aus (Lanier et al. 1989, Lanier et al. 1991).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung des FcyRIIIa Rezeptors auf NK-Zellen. FcyRIIIa bindet IgG1-Antikörper wie Cetuximab über deren *hinge region*, wobei die zweite-IgG ähnliche Domäne (D2) einen direkten Kontakt herstellt. Über die ITAM-tragende Signaldomänen des Rezeptors wird daraufhin eine intrazelluläre Aktivierung ausgelöst, die zu Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität (ADCC) führt. Adaptiert nach Takai (Takai 2002).

Es sind zwei verschiedene Genpolymorphismen bekannt, die für den Fc γ RIIIa (CD16a) codieren. Ein Nukleotidaustausch an Position 559 (T⁵⁵⁹–>G) des Fc γ RIIIa-Gens sorgt für einen Valin (V)- oder Phenylalaninrest (F) an der Aminosäureposition 158 des Rezeptors und somit für zwei Fc γ RIIIa-Allotypen. In Studien führten diese Polymorphismen zu einer unterschiedlichen Affinität zu humanem IgG1 (Ravetch et al. 1989, Wu et al. 1997).

Der FcγRIIIa wurde in klinischen Studien mit Krankheitsprogression und dem Ansprechen auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern korreliert (Clynes et al. 2000). In Studien mit Rituximab und Trastuzumab wurde beobachtet, dass der 158V-Polymorphismus des FcγRIIIa eine höhere Bindeaffinität zu IgG1 besitzt. Bei Patienten mit Lymphom oder Brustkrebs, die diesen Polymorphismus trugen, kam es zu höheren Ansprechraten auf die Therapie mit Rituximab und Trastuzumab (Cartron et al. 2002, Musolino et al. 2008, Weng et al. 2003). Auch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die einen 158V/V-Genotyp des FcγRIIIa auf NK-Zellen trugen, konnte ein bis zu drei Monate verlängertes progressionsfreies Überleben unter der Behandlung mit Cetuximab und Irinotecan im Vergleich zu Patienten mit dem 158F-Allel festgestellt werden, unabhängig von ihrem KRAS-Mutationstatus (Bibeau et al. 2009). Da das 158V-Allel in der Bevölkerung unterrepräsentiert ist (≈20% V/V, 40% V/F, und 40% F/F) (Koene et al. 1997, Lazar et al. 2006, Wu et al. 1997), kann derzeit jedoch nur eine geringe Zahl an Patienten zusätzlich von der Cetuximab-Therapie profitieren.

Mehrere Arbeitsgruppen haben seitdem versucht, diesen Effekt nachzuvollziehen und gelangten zu unterschiedlichen Ergebnissen darüber, welcher FcγRIIIa-Polymorphismus das beste klinische Ansprechen unter Cetuximabtherapie vermittelt. Klinische Studien konnte den 158V-Polymorphismus des FcγRIIIa mit einem verbesserten Gesamt- und progressionsfreiem Überleben bei KRK-Patienten, die Cetuximab erhielten, verbinden (Calemma et al. 2012, Etienne-Grimaldi et al. 2012, Rodriguez et al. 2012). Allerdings konnten andere Publikationen keinen signifikanten Unterschied im Therapieansprechen zwischen Patienten mit FcγRIIIa-158V/V, V/F oder F/F Genotyp feststellen (Graziano et al. 2008, Paez et al. 2010). Ein genaueres Wissen über den Effekt der verschiedenen FcγRIIIa-Polymorphismen auf die Wirkung von Cetuximab beim kolorektalen Karzinom und dessen Konsequenz für die ADCC würde es erlauben dort ansetzende Therapie zu entwickeln.

1.5 T-Zellen im Kolonkarzinom

Die Immuntherapie von Tumoren basiert größtenteils auf der Gabe von Antikörpern gegen Signalrezeptoren oder Tumorantigene. Deren Effektivität und klinischer Erfolg sind jedoch von dem Vorhandensein von Effektorzellen mit ADCC-Aktivität, also mit FcγRIIIa-Rezeptoren, im Tumorinfiltrat abhängig. Bei Patienten mit weit fortgeschrittener Tumorkrankheit und hoher Tumorlast ist das ADCC jedoch signifikant vermindert (Kono et al. 2002), da sowohl die Erkrankung und zytostatische Regimes das Immunsystem schwächen. Dabei spielen möglicherweise die Chemotherapie-induzierte Leukopenie und eine NK-Zell-Erschöpfung eine Rolle (Kohrt et al. 2012, Kono et al. 2002, Lo Nigro et al. 2016). Auch wenn die Vermittlung von ADCC durch monoklonale Antikörper wie Cetuximab *in vitro* vielversprechend erscheint, ist also nicht geklärt, wie das Konzept zur Bekämpfung der metastatischen Erkrankung genutzt werden kann. Ebenso ist fraglich, welche Immunzellen überhaupt weit genug in den Tumor vordringen um hier direkt und über Interaktion mit einem Antikörper wirken zu können.

Da ein Großteil an *in vitro*-vermitteltem ADCC durch NK-Zellen beobachtet wurde, sah man diese Zellen lange als Hauptvermittler des ADCC an (Houot et al. 2011, Nimmerjahn et al. 2008). Diese Annahme könnte jedoch dadurch verzerrt sein, dass NK-Zellen im Blut häufig anzutreffen sind, und eine Großzahl der *in vitro*-Versuche mit aus PBMCs isolierten Zellen durchgeführt wurden. In das Tumorgewebe dringen NK-Zellen nachgewiesen wenig vor (Albertsson et al. 2003), weshalb ihr

Beitrag zum ADCC in soliden Tumoren wie dem KRK zunehmend angezweifelt wird (Desjarlais et al. 2007, Marechal et al. 2010). Im Patienten scheinen gemäß aktueller Forschung andere Immunzellen für das Voranschreiten oder Aufhalten von Tumorerkrankung bedeutsamer zu sein. Anders als NK-Zellen sind beispielsweise Makrophagen nicht im Blut, aber in hoher Zahl im Tumor vorhanden (Sconocchia et al. 2011). Während ihnen lange eine fördernde Rolle im Tumorwachstum zugeschrieben wurde, deuten präklinische Studien darauf hin, dass Makrophagen über FcγRIIIa kritisch für mAb-vermittelte Immunreaktionen gegen Tumoren sind (Grugan et al. 2012, Taskinen et al. 2007).

Unter den soliden Tumoren nimmt das Kolonkarzinom eine besondere Rolle ein. Hier wurde bewiesen, dass die Immunzellinfiltration von CD16-positiven, also den FcγRIIIa tragenden Zellen mit einem besseren Überleben verbunden ist, sogar in der Anwesenheit von bekannt immunsuppressiven Zellen wie tumorassoziierten Makrophagen und regulatorischen T-Zellen. Zum großen Teil waren diese CD16-positiven Zellen unreife Monozyten und Vorläuferzellen von Makrophagen (Sconocchia et al. 2011). Auch die Infiltration mit Makrophagen wurde entgegen deren Rolle in den meisten soliden Tumoren im Kolonkarzinom mit einer guten Prognose assoziiert (Forssell et al. 2007).

Noch eindeutiger wurde jedoch gezeigt, dass eine starke Infiltration durch T-Zellen in Tumoren und insbesondere im Kolonkarzinom das Tumorwachstum aufhalten kann (Galon et al. 2006). Eine hohe Dichte an CD8⁺, CD3⁺ und CD45⁺-Gedächtnis-T-Zellen im Zentrum und im invasiven Rand der Tumoren geht mit einem längeren krankheitsfreien Überleben und niedrigerem Risiko von Rückfall und Metastasierung einher (Galon et al. 2006, Mlecnik et al. 2011, Pages et al. 2005, Pages et al. 2009). Auch in den klinisch weniger aggressiven Mikrosatellit-instabilen Kolonkarzinomen sind T-Zellinfiltrationen häufiger, was ebenfalls für die kontrollierende Wirkung von T-Zellen spricht (Guidoboni et al. 2001). Die Infiltration mit T-Zellen hat maßgeblich Einfluss auf das Voranschreiten des kolorektalen Karzinoms. Das macht die für hämatologische Tumorkrankheiten bereits mögliche, autologe Zelltherapie mit T-Zellen für diesen Tumor besonders vielversprechend.

1.6 Fragestellung

In der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms kommt der monoklonale Antikörper Cetuximab zum Einsatz. Jedoch können nicht alle Patienten von dieser Therapie in gleichem Maße profitieren, da aktivierende Mutationen im Bereich des EGFR-Signalweges zu einer Cetuximab-Resistenz führen (Karapetis et al. 2008, Van Cutsem et al. 2009). In einigen Studien wurde eine mögliche Bedeutung von Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern vermutet (Kohrt et al. 2012). Bei Trägern von bestimmten höher affinen

1. Einleitung

Varianten des FcγRIIIa wurde sogar ein besseres Therapieansprechen auf Cetuximab-Therapie beobachtet (Bibeau et al. 2009).

Gleichzeitig legen Analysen der Immunologie des Kolonkarzinomes die Möglichkeit nahe, dass T-Zellen hier nicht nur eine besondere Rolle spielen, sondern auch die Möglichkeit besitzen dort aktiv einzuwandern. Eine Möglichkeit, die Resistenz von kolorektalen Tumorzellen gegen Cetuximab zu überbrücken, wäre die Überexpression des höher affinen FcγRIIIA-158V-Rezeptors in T-Zellen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch den Einsatz von FcγRIIIa-158V-transduzierten T-Zellen und Cetuximab die Therapieresistenz von KRAS-mutierten Kolonkarzinomzellen überwunden werden kann. In der vorliegenden Arbeit nutzen wir retrovirale Vektoren um genmodifizierte T-Zellen herzustellen, die drei verschiedene Polymorphismen des FcγRIIIa-Rezeptors tragen, und untersuchten ihre Fähigkeit, in Anwesenheit von Cetuximab ADCC gegen kolorektale Tumorzellen zu bewirken.

Dabei sollen folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- 1. Sind FcyRIIIa in T-Zellen exprimierbar?
- 2. Welcher FcyRIIIa-Polymorphismus bindet Cetuximab am stärksten?

3. Wie sensitiv sind KRAS-mutierte Kolonkarzinomzellen auf die Behandlung mit Cetuximab in Anwesenheit von FcγRIIIa-158V/V transduzierten T-Zellen?

4. Welcher FcyRIIIa-Polymorphismus vermittelt die stärkste Zytotoxizität?

2 Material

2.1 Ausstattung und Geräte

Alpha Imager Hp gel imager CO₂ Inkubator (BD 6220) Elektrophoreseapparatur 200/2.0 FACS Canto II Mithras LB 940 Multilabel Plate Reader Mikroskop Axiovert 25 Multifuge 3L-R Nanophotometer Power Supply 200/2.0 Pipetboy pH-Meter inoLab® Reinstwasseranlage Rotina 420R Schüttler Thermocycler T3 Thermomixer Transilluminator 2011 Macrovue Vortexer VF2 Waage CPA1003S Zellkultur Laminar Flow Zentrifuge 5417 R Zentrifuge 5424

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Agarose LE Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Calciumchlorid Merck, Darmstadt, Deutschland Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Ethidiumbromid Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland FACSFlow Becton Dickinson, San Jose, USA Isopropanol (70 Vol%) Apotheke Innenstadt, LMU München Paraformaldehyd (PFA) Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Trypanblau Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Alpha Innotec, Kasendorf, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Bio-Rad, München Becton Dickinson, San Jose, USA Berthold, Bad Wildbad, Deutschland Zeiss, Jena, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Implen, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt WTW GmbH, Weilheim, Deutschland Millipore, Billercia, USA Hettich AG, Bäch, Schweiz NeoLab, Heidelberg, Deutschland Biometra, Göttingen, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland LKB, Bromma, Schweden Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Trypsin (10 x)PAA, F6 X Orange DNA Loading DyeThermO'GeneRuler DNA Ladder MixTherm

PAA, Pasching, Österreich Thermo Scientific Waltham, MA, USA Thermo Scientific Waltham, MA, USA

2.3 Materialen, Reagenzien und Medien für die Zellkultur

2.3.1 Materialien und Reagenzien

Ampicillin	Invivogen, San Diego, CA, USA
Blasticidin	Invivogen, San Diego, CA, USA
Biocoll	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle´s medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Steinheim, DEU
Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, Deutschland
(1x)	
Fetales Kälberserum <i>(FBS)</i> (hitzeinaktiviert [30 min / 56°C])	GibcoBR, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, Österreich
MACS Anti-APC MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Puromycin	Invivogen, San Diego, CA, USA
RetroNectin	Takara Bio Inc., Shiga, Japan
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	PAA, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
TransIT®-293 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC., Madison, WI, USA
anti-CD28 beads	Life Technologies, Carlsbad, USA
anti-CD3 beads	Life Technologies, Carlsbad, USA
IL-15	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-2	Peprotech, Hamburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

2.3.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

6-well Platte (ZKT)	Costar Corning, New York, USA
24-well Platte (ZKT)	Costar Corning, New York, USA
96-U-well Platte (ZKT)	Costar Corning, New York, USA
96-flat-well Platte (ZKT)	Costar Corning, New York, USA
96-flat-well Platte (ZKT)	Brandt, Wertheim, Deutschland
Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

FACS-Röhrchen Falcon (5 ml, 15 ml, 50 ml) Filter, steril (0,2 µm *pore*) Filter, Virus (0,45 µm *pore*) Kryoröhrchen Parafilm Petrischalen

Parafilm Petrischalen Pipettenspitzen Polypropylene *round bottom tube* Tube (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) Zellkulturflaschen Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Falcon (5 ml, 15 ml, 50 ml) Sartorius, Göttingen, Deutschland Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland greiner bio-one, Frickenhausen Bemis, Neenah, Wl, USA Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Sarstedt, Nümbrecht Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Sarstedt, Nümbrecht

2.3.3 Medien zur Zellkultur und Puffer

DMEM +++	
DMEM Vollmedium	500 ml
Hitzeinaktiviertes FBS	10 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %
Plat E-Medium	
DMEM Vollmedium	500 ml
Hitzeinaktiviertes FBS	10 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %
Blasticidin	10 µg/ml
Puromycin	1 µg/ml
Hunger-Medium	500 ml
DMEM Vollmedium	3 %
Hitzeinaktiviertes FBS	1 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin / Streptomycin	10 µg/ml
Blasticidin	1 µg/ml
Puromycin	
<u>Medium zur Kryokonservierung</u>	
DMEM Vollmedium	50 %
FBS	40 %
DMS	10 %

500 ml **RPMI Vollmedium** FBS 10 % 1 % L-Glutamin Penicillin/Streptomycin 1 % Humanes T-Zellmedium (hTCM) VLE RPMI 500 ml Streptomycin / Penicillin 1 % L-Glutamin 1 % NEAA 1 % 1 % Natriumpyruvat HBSS Puffer (Hank's buffered

salt solution)	
Natriumchlorid	1.6 g
Kaliumchlorid	74 mg
Na ² HPO ₄	50 mg
HEPES	1 g
in 100 ml ddH ₂ O, pH-Wert	7.06

MACS-Puffer

RPMI +++

PBS	500 ml
EDTA	2 mM

2.4 Antikörper

Name	Klon / Isotyp	Konzentration	Hersteller
APC anti-human CD16	3G8 / Mouse IgG1 к	1:100	BioLegend, San Diego, USA
APC Mouse IgG1, к Isotype Ctrl	MOPC-21 / Mouse IgG1 к	1:100	BioLegend, San Diego, USA
FITC-conjugated F(ab') ² Fragment Goat Anti- Human IgG, F(ab') ² Fragment Specific	Polyklonal	1:100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
anti-human CD3	HIT3a	1:500	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
anti-human CD28	CD28.2	1:500	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Cetuximab (Erbitux [®])	C225	1:1000 bis 1:2	Merck Serono, Darmstadt, Deutschland
Rituximab (MabThera [®])	10F381	1:10	Roche Pharma AG, Grenzach, Deutschland

2.5 T-Zelllinien und Verpackungszellinien

Name	Ursprung	Medium
Plat E	Humane embryonale Nierenepithelzellinie	Plat E Medium
Phoenix A	Humane embryonale Nierenepithelzellinie	DMEM +++
HEK293T	Humane embryonale Nierenepithelzellinie	DMEM +++
Jurkat	Immortialisiertes T-Zelllymphom	RPMI +++
B3Z	murines T-Zell Hybridom	RPMI +++

2.6 Zelllinien des humanen kolorektalen Karzinoms

Name	KRAS	BRAF	PIK3CA	Quellen	Medium
CaCo2	-	-	-	(Magudia et al. 2012)	DMEM +++
Colo205	-	V800E	-	(Di Nicolantonio et al. 2008)	RPMI +++
HCT116	Gly12Val	-	mutiert	(Benvenuti et al. 2007, Jhawer et al. 2008)	DMEM +++

2.7 Enzyme

Pfu-DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Rockford, USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, Rockford, USA
Notl	Thermo Scientific, Rockford, USA
EcoRI	Thermo Scientific, Rockford, USA
Buffer O (10X)	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.8 Oligonukleotide

Die Auswahl der Primersequenz erfolgte über die Genbank des National Center of Biotechnology Information. Zur Konzipierung der Primer wurde die Software Lasergene (DNASTAR, Madison, Wisconsin) verwendet. Die spezifischen Primer für die jeweiligen Polymorphismen des FcyRIIIa (CD16a) wurden daraufhin bei der Firma Metabion (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland) bestellt.

Name	Nukleotidsequenz
Notl CD16a tv5 for	5'-ATT AGC GGC CGC ATG TGG CAG CTG CTC CT-3'
Notl CD16a tv1 for	5'-AAT AGC GGC CGC AAT GGG GG AGGGGC TG-3'
CD16a EcoR1 rev	5'-TAA TGA ATT CTC ATT TGT CTT GAG GGT CC-3'

2.9 Vektoren und Inserts

pMP71	Prof. Dr. C. Baum, Medizinische Hochschule, Hannover, Deutschland		
pcDNA3.1- MLVg/p und pALF10A1 CD16a 158V/48L cDNA (<i>transcript variant 1</i>)	Prof. Dr. W. Uckert, Max-Delbrück-Centr Berlin, Deutschland Origene Technologies, Rockville, USA		
CD16a 158F/48L cDNA (transcript variant 5)	Origene Technologies, Rockville, USA		
CD16a 158V/48H pcDNA3.1	M. Ohresser, GICC, Universität François Rabelais, Tours, Frankreich		

2.10 Kits und Assays

CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
CytoTox 96 [®] NonRadioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Watham, USA
JetQuick [®] Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
Maxi-Prep Kit	Promega Corporation, Madison, USA
Sequenzierung	Metabion, Planegg, Deutschland
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, USA

2.11 Software

Adobe Illustrator CS3	Adobe System, San Jose, USA
EndNote X8	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
FlowJo 8.7.	Tree Star, Ashland, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism 5.0b	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Lasergene Suite	DNASTAR, Madison, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die cDNA wurde mit Hilfe einer DNA-Polymerase (s. 2.6. Enzyme) amplifiziert. Im Thermocycler liefen nacheinander folgende Reaktionszyklen ab:

Tabelle 1 PCR Reaktionszyklen

Denaturierung	94°C	30 sec	٦
Annealing	55°C	30 sec	> 30-35 Zyklen
Extension	72°C	2 min pro kbp	J
Elongation	72°C	10 min	

Ein PCR-Ansatz von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2: PCR Ansatz

Bestandteil	Menge
10X Pfu Puffer +MgSO ₄	5 µl
DNA	1 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
dNTP Mix	1 µl
Pfu Polymerase	1 µl
steriles H ₂ O	auf 50 µl aufgefüllt

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch (Implen Nanophotometer, Implen GmbH, München, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

3.1.3 Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines 0,8 bis 1,2 % prozentigen Agarosegels wurden 1,7 g Agarose in 150 µl Tris Acetat Puffer (TAE-Puffer) durch Erhitzen gelöst und zusammen mit 5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) in eine Elektrophoresekammer gegeben. Daraufhin wurden die Proben mit 1:6 6X Ladepuffer versetzt, in die Gelkammern gefüllt und bei einer Spannung von 90 bis 100 V in verschiedene Banden aufgetrennt, die unter UV-Licht analysiert werden konnten. Die gesuchte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem JetQuick[®] Gel *Extraction Spin Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligationen können DNA-Fragmente in einen Vektor integriert werden. Diese wurden in äquimolarer Menge mit Vektor-DNA gemischt und durch eine T4 Ligase verknüpft. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 3: Ligationsansatz

Bestandteil	Menge
Vektor DNA	1 µl
Insert DNA	6 µl
T4 Ligase	2 µl
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
H ₂ O	aufgefüllt auf 20 µl

Nach 20 - 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 5 - 10 μ I des Reaktionsansatzes zur Transformation von 100 μ I kompetenter DH5 α *E. coli* verwendet.

3.1.5 Restriktionsverdau

Jeder Verdau durch Restriktionsenzyme wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde nach nachfolgendem Ansatz mit Restriktionsenzymen und Puffern inkubiert (37°C / 60min):

Tabelle 4: Restriktionsverdau

Bestandteil	Menge
DNA	500 - 1500 ng
Empfohlener 10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzyme	je 10 U
Steriles H ₂ O	aufgefüllt auf 20 µl

3.1.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Konstrukte wurden in einem *Kit* mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern versetzt und durch die Firma Eurofins MWG Operon in beide Richtungen sequenziert.

3.1.7 Herstellung kompetenter E. coli

Nach Expansion der Bakterien in 100 ml LB Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,44 - 0,55 wurde das Medium auf 4°C abgekühlt und die Bakterien über Zentrifugation (4000 rpm

über 10 min) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Bakterien in 30 ml Transfektionspuffer I wurden die Bakterien inkubiert (4°C / 5 min) und durch Zentrifugation (4000 rpm über 10 min) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Bakterien in 4 ml Transfektionspuffer II wurden Aliquots (je 50 - 100 µl) in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.8 Transformation und Plasmidamplifikation

Transformation beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA in ein Wirtssystem mithilfe eines Plasmids. Hierzu wurde die Bakteriensuspension des Stammes *E. coli* DH5α zusammen mit der Plasmidlösung (bei Transformation 10 µl des Ligationsansatzes, bei Retransformation 1 µg DNA) in drei Schritten (1.15 min / Eis, 2. 45 sec / 45°C, 3. 30 min / Eis) inkubiert. Daraufhin wurden zunächst von jedem Klon der Bakterien Vorkulturen in 100 µl LB-Medium angelegt (60 min bei 37°). Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in 50-100 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agarplatte ausgestrichen und inkubiert (12 h bei 37°C). Am nächsten Tag konnten Kolonien ausgewählt und in 5 ml LB-Amp-Medium als Mini-Kultur hochgezogen werden. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterienpellets erfolgte mit speziellen *Kits* (s. 2.9. *Kits* und Assays) gemäß Herstellerangaben. Die Bakterien werden zentrifugiert (4000 g für 10 min) und die DNA aus den Bakterienpellets mit einem *Maxiprep-Kit* (s. 2.9. *Kits* und Assays) gemäß Herstellerangaben isoliert.

3.2 Allgemeine Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Anteil von 5%. Vor dem Erreichen der Maximaldichte wurden die Zellen passagiert und das Zellmedium zwischenzeitlich erneuert. Sämtliche Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Air Flow durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 400 g und 5 min statt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ermittelt. Durch die Zugabe von Trypanblau in einem Verhältnis von 1:10 wurden nicht-viable Zellen blau angefärbt und von der Zählung ausgeschlossen.

3.2.3 Viabilitätsversuche

Die Anzahl der viablen Zellen in einer Multiwell-Platte wurde mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. 2,5 - 10 × 10⁵ Zellen pro 100 µl Vollmedium wurden einer 96 Well-Platte über Nacht inkubiert und adhäriert, um am nächsten Tag zu den verschiedenen

Konditionen (Cetuximab, Rituximab, Kontrollen) zu wechseln. Nach einer Inkubationszeit von 48 -72 h Stunden wurden je 20 µl CellTiterBlue Substrat zu jedem Well gegeben und für 1 bis maximal 4 h bei 37°C inkubiert, bis sich die Farbe von blau nach violett änderte. Die Fluoreszenz (F) wurde im Mithras LB940 Multi Label Plate Reader bei 560/590 nm bestimmt. Die Viabilität der Zellen wurde prozentual in Bezug auf die Kontrollen (100 %) angegeben: Viabilität % = ($F_{Probe}/F_{Kontrolle}$) × 100

3.2.4 Zytotoxizitätsversuche

Zur Feststellung von Zelllyse in Kokulturen von Effektor- und Zielzellen in Anwesenheit von Cetuximab wurde der CytoTox 96® NonRadioactive Cytotoxicity Assay (Promega) verwendet, der das bei Zelltod ausgeschüttete LDH quantitativ bestimmt. Als Effektorzellen wurden CD16transduzierte Jurkat T-Zellen eingesetzt. Kolorektale Karzinomzellen wurden über Nacht in einer Konzentration von 2 x 10⁴ in 96-Well *U-bottom* Platten in farblosem Vollmedium ausgesäht. Am nächsten Tag wurden Effektorzellen als Dilutionsreihe von 4 x 10⁵ Zellen pro Well (Effektor-/Zielzellratio 20:1) bis zu 2 x 10⁴ Zellen/Well (1:1) und Cetuximab in einer Konzentration von 10 μ g/ml hinzugefügt. Der Spontan*release* (SR, Negativkontrolle) wurde durch alleinige Inkubation der Zielzellen sowie Effektorzellen der entsprechenden Konzentrationen bestimmt. Der Maximum*release* (MR, Positivkontrolle) wurde nach Hinzugabe von 2 % Triton X-100 zu den Zielzellen gemessen. Nach 6 h Inkubation bei 37°C in 5 % CO₂ wurden die Versuchsplatten zentrifugiert, der Überstand in eine 96-Well flat-bottom Platte überführt und mit den Reaktionsreagenzien nach Herstellerangaben inkubiert. Die spezifische Lyse wurde gemäß folgender Formel berechnet:

3.2.5 Lymphozytenisolation

Zur Isolation peripherer, mononukleärer Zellen (PBMC) aus heparinisiertem Vollblut wurde eine Dichtezentrifugation in Biocoll (Biochrom) einer Polysaccharose der Dichte von 1,077 g/ml nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3 Retrovirale T-Zell Transduktion

3.3.1 Herstellung eines Retrovirus durch Transfektion einer Verpackungszelllinie

Transfektion bezeichnet das Einbringen von fremder DNA in eukaryotische Zellen, wodurch es zu einer transienten Expression in der Zielzelle kommt und zur Produktion von Viruspartikel. Zur Transfektion der murinen Verpackungszelllinie Plat E und der humanen Verpackungszellen Phoenix A, wurde das Prinzip der Calcium-Phosphat-vermittelten Transfektion (Chen und Okayama, 1987) angewandt (Chen et al. 1987). Die Zellen wurden in einer Dichte von 1 - 1,5 × 10⁶

Zellen pro Well auf einer 6-Well Platte inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz von 60 – 70 % wurde das Medium am nächsten Tag zu einem Hungermedium mit 3% FBS gewechselt und die Zellen für 30 - 60 min im Inkubator belassen. In der Zwischenzeit wurde folgende Plasmidlösung hergestellt:

Tabelle	5	Herstellung	der	Plasmidlösung	J
---------	---	-------------	-----	---------------	---

Substanz	Stock-Konzentration	finale Konzentration	verwendete Menge
Plasmid DNA			18 µg
Chloroquin	100 mM	126,7 µM	0,38 µl
CaCl ₂	2 M	100 mM	15 µl
Steriles H ₂ O			aufgefüllt auf 150 µl

Die Plasmidlösung wurde unter Vortexen zur Stabilisierung des pH-Wertes mit 150 µl eines zweifachen HBSS-Phosphat-Puffers gemischt (s. 3.2.3) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das nun ausgefallene Präzipitat von DNA und Calcium-Phosphat wurden der Zellkultur zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde das Hungermedium abgenommen und durch 3 ml regulären DMEM-Mediums (PlatE- oder Phoenix-Medium) ersetzt. Nach 42 h konnte der Virusüberstand abgenommen und durch sterile Filtration durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter (Millipore Corporation, Bedford, USA) von Zelldebris befreit werden. Die Verpackungszelllinie wurde mit 3 ml frischem Medium versorgt, um eine erneute Virusernte am nächsten Tag zu ermöglichen. Zur Transduktion primärer humaner T-Zellen wurden 3.5 x 10⁶ HEK293T-Zellen in 10 ml DMEM ausplattiert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz von 80 % nach ca. 24 h wurde die Transfektion mittels eines spezifischen 293T-Transfektionsreagenz durchgeführt (s. 2.3.1) Dazu wurden 30 µl des Transfektionsreagenz in 170 µl DMEM mit 12,5 µg DNA zusammengesetzt aus 3,125 µg env10A1, 4,6874 µg gag/pol und 4,6874 µg der Plasmid-DNA für 15 min bei RT inkubiert. Nach Mediumwechsel zu RPMI-Medium wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise den HEK293T-Zellen zugegeben. Nach 48 h wurden 2 ml des Mediums ersetzt und nach weiteren 72 h der Virusüberstand von 10 ml abgenommen, gefiltert und schockgefroren.

3.3.2 Retrovirale Transduktion von T-Zelllinien

Transduktion bezeichnet die Infektion von Zielzellen mit viralen Vektoren, wobei die DNA stabil in das Genom integriert wird um eine dauerhafte Expression des zu untersuchenden Gens in der Zielzelle zu erlauben. In dieser Arbeit wurde eine 24-Well-Platte mit 400 µl RetroNectin (12,5 µg/ml) pro Well beschichtet und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. RetroNectin ist ein von Fibronektin abgeleitetes rekombinantes Peptid, welches Viruspartikel und Proteine an der Zelloberfläche bindet und so den stabilen Gen-Transfer verstärkt. Anschließend wurde das RetroNectin abgenommen, für 30 min die Wells mit 500 µl 2% BSA in sterilem H₂O bei 37°C geblockt und zweifach mit 1 ml PBS + 25 mM HEPES gewaschen. Daraufhin wurde je 1 ml pro Well des zuvor filtrierten retroviralen Überstandes für 2 h in der beschichteten Platte zentrifugiert (4°C, 3000 g). Der Virusüberstand

wurde verworfen und die T-Zellen in einer Konzentration von 10⁵ Zellen pro Well in 1 ml Medium in den mit RetroNectin und Virus beschichteten Well gegeben und zentrifugiert (32°C, 800 g, 30 min). Dem Medium wurden 4 µl Protaminsulfat und 5 µl 10 mM HEPES-Puffer zugefügt um die Transduktionseffizienz zu steigern. Am nächsten Tag wurde mit dem neu gewonnenen Virusüberstand eine weitere Transduktion der T-Zellen mit Virusüberstand durchgeführt. Hierbei wurde erneut 1 ml Virus zu den bereits transduzierten T-Zellen hinzugegeben und zentrifugiert (32°C, 800 g, 90 min). Nach einer Inkubationszeit von 12 - 16 h wurden die T-Zellen zur Kultivierung in 3 ml frischen Medium aufgenommen und auf eine 12-Well-Platte übertragen. Nach frühestens 48 h konnte die Transduktionseffizienz der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden.

3.3.3 Retrovirale Transduktion von primären humanen T-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Transfektion und Transduktion von T-Zellen orientiert sich an einem publizierten Protokoll zur Transduktion primärer humaner T-Zellen. Hierzu wurde die benötigte Anzahl an Wells einer 6-Wellplatte mit anti-humanem CD3- Antikörper (Verdünnung 1:500) und anti-humanem CD28-Antikörper (Verdünnung 1:500) in 1,2 ml PBS über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei 37°C vorinkubiert. PBMCs wurden aus der Vollblutprobe eines Spenders durch Biocoll-Zentrifugation gewonnen und die T-Zellen durch anti-human CD3+ MACS Beads aufgereinigt. Die so isolierten T-Zellen wurden in einer Konzentration von 10⁶ pro ml in 3 - 4 hTCM mit 5 % humanem Serum, 200 U/ml IL-2 und 5ng/ml IL-15 sowie 50 μM β-Mercaptoethanol separat in den Wells gegeben. Dazu wurden humane anti-CD3- und anti-CD28-Dynabeads in einem Verhältnis von drei Zellen pro Bead gegeben. Zur Transduktion der Zellen wurde die kalkulierte Anzahl von Wells in 24 Wellplatten mit 6.25 µg/ml RetroNectin in 400 µl PBS pro Well über Nacht für 4°C oder für 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die vorbeschichteten Wells mit 1 ml steriler 2% BSA Lösung in PBS für 30 min bei RT geblockt. 1 ml des durch Transfektion von HEK-Zellen gewonnen Virus wurde in die Wells für erste und zweite Transduktion überführt und bei 3000 G und 37°C für 1,5 h zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die einfach transduzierten T-Zellen resuspendiert in 0.5 x 10⁶/ml frischem hTCM über Nacht bei 37° inkubiert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen auf die zweite Platte transferiert und für 6 h bei 37°C inkubiert. Nach 6 h konnten die T-Zellen in einer Konzentration von 0.25 x 10⁶/ml in frischem Medium resuspendiert und in einem Volumen von 3 bis 4 ml in einer 6-Wellplatte ausplattiert werden. Die Transduktionseffizienz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Erneuerung des Mediums erfolgte je nach Verbrauch und Zelldichte alle 4 Tage.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Magnetic-activated cell sorting (MACS)

Zur Aufreinigung der mit dem zu untersuchendem Rezeptor transduzierten T-Zellen der Zelllinie Jurkat wurde *Magnetic-activated cell sorting* (MACS) eingesetzt. Dazu wurden die Oberflächenmoleküle mit Allophyocyanin (APC)-konjugierten Antikörpern markiert und in einem zweiten Schritt mit Antikörpern gegen APC, die an magnetischen *Beads* gebunden sind, markiert. Führt man diese Zellsuspension durch Säulen, die in einem starken magnetischen Feld befestigt sind, wird die *Bead*-markierte Zellfraktion in der Säule gefangen. Nach Aufhebung des magnetischen Feldes konnte so eine Reinheit von über 99% APC-positiver Zellen in der Zellsuspension erreicht werden.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Größe, Granularität sowie zuvor markierte Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen durch fluoreszierende Antikörper markiert und in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messkammer geführt. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenantigen.

3.4.3 Oberflächenfärbung

Für die FACS-Analysen wurden 2 x 10⁵ bis 10⁶ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (400 g, 5 min), der Überstand abgeschüttet und im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (0,5 μl je Antikörper) für 15 - 30 min unter Lichtausschluss inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Als Fluorochrome wurden dabei Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder APC verwendet. Zum Ausschluss unspezifischer Bindung wurde bei jeder FACS-Färbung eine Negativkontrolle mit fluoreszierenden Antikörpern des gleichen Isotyps verwendet. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde am FACSCanto II gemessen und mit der FlowJo Software analysiert.

3.4.4 Detektion von Antikörper-Bindung

Um die Antikörper-Bindungskapazität der FcγRIIIa-Rezeptorpolymorphismen zu messen wurden mit den FcγRIIIa-Polymorphismen transduzierte und untransduzierte B3Z T-Zellen (1.5 x10⁵) für 30 min bei 4°C mit Cetuximab (Erbitux, Merk 0.1–50 mg/ml) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem FITC- konjugiertem anti-humanen IgG Antikörper (F(ab')₂-fragmentspezifisch) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die

Antikörper-Antikörper Bindung mit 100 µl 0,25% Formaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und die Färbung der Zellen nach weiterem zweimaligen Waschen am FACSCanto II gemessen.

3.5 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt, wobei die statistische Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test berechnet wurde. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Direkte Effekte von Cetuximab auf Kolorektal-Karzinom-Zelllinien

Zunächst haben wir verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien mit bekanntem Mutationsstatus im EGFR-Signalweg auf ihre Sensibilität gegenüber Cetuximab untersucht. Hierzu wurden die humanen kolorektalen Karzinomzelllinien Colo205, HCT116 und CaCo2 verwendet, deren Mutationsstatus vorbeschrieben ist. Zur Überprüfung von Resistenz und Sensibilität auf Cetuximab wurde der *Cell Titer Blue*-Viabilitätsassay eingesetzt. Um die spezifische Wirkung von Cetuximab auf den Zellzyklus nachzuweisen und unspezifische Effekte auszuschließen, wurde Rituximab als negative Kontrolle verwendet.

Die RAS-Wildtyp tragende aber BRAF-mutierte Colo205-Zelllinie wurde durch Cetuximab in ihrem Wachstum nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 3A). Im Experiment mit der Zelllinie HCT116, die über ein mutiertes KRAS-Protein sowie eine Mutation im PIK3CA verfügt (Benvenuti et al. 2007, Jhawer et al. 2008), war ebenfalls, wie erwartet, kaum ein feststellbarer Viabilitätsunterschied im Vergleich zu unbehandelten Zellen sichtbar. Lediglich in einer Konzentration von Cetuximab von 100 µg/ml konnte eine geringe Herabsetzung der Viabilität festgestellt werden (Abbildung 3B).

Im Gegensatz dazu konnte bei der Kolonkarzinomzelllinie CaCo2, die ein RAS-Wildtyp-Protein besitzt, eine signifikante Suppression der Viabilität durch Cetuximab im Vergleich zu unbehandelten Zellen von 35 - 40 % beobachtet werden (s. Abbildung 3C). Somit eigneten sich die resistenten Zelllinien Colo205 und HCT116 optimal für unsere weiteren Experimente.



Abbildung 3: Die Viabilitätsherabsetzung von Kolonkarzinomzellen durch Cetuximab ist abhängig von Mutationen im EGFR-Signalweg. Die Tumorzelllinien Colo205 (A) HCT116 (B) und CaCo2 (C) wurden in 96 Well-Platten zu 2,5 - 10×10^5 Zellen in 100 µl Vollmedium ausplattiert. Nach Adhärenz nach ca. 24 h wurde mit Cetuximab oder Rituximab (1, 10 respektive 100 µl/ml) für 48 - 72 h inkubiert. Die Fluoreszenz nach Zugabe des CellTiterBlue-Substrats wurde im Mithras LB940 Multi Label Plate Reader bei 560/590 nm bestimmt. Das Ergebnis beschreibt die prozentuale Abweichung der Viabiliät von der unbehandelten Kontrolle. Jeder Wert ist der Mittelwert aus Triplikaten einer Probe ± SEM. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. **P < 0,01, ***P < 0,001, ns bedeutet nicht signifikant.

4.2 Klonierung der retroviralen Expressionsvektoren für FcyRIIIa

Um die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität durch FcγRIIIa transduzierte T-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurden unterschiedliche genetische Varianten des FcγRIIIa-Rezeptors in einen Expressionsvektor kloniert. Anschließend sollten diese durch retrovirale T-Zell-Transduktion in murinen sowie humanen T-Zelllinien stabil exprimiert werden. Es wurden drei Varianten des FcγRIIIa untersucht, die Polymorphismen in zwei Genloci trugen, ein FcγRIIIa-158F/48L, sowie jeweils ein FcγRIIIa-158V mit 48L bzw. 48H-Polymorphismus (FcγRIIIa-158F/48L und FcγRIIIa-158F/48H). Die jeweilige CD16-cDNA wurde dazu aus ihrem Ursprungsvektor geschnitten, durch PCR mittels spezifischer Primer vervielfältigt und als Notl/EcoRI-Fragment in ein retrovirales Plasmid kloniert.



Abbildung 4: PCR der cDNA für die Rezeptoren FcyRIIIa 158V/48L, FcyRIIIa 158F/48V und FcyRIIIa 158V/48H. Die cDNA wurde aus Ursprungsvektoren geschnitten, mittels spezifischer Primer mit Schnittstellen für EcoRI und Notl versehen und durch PCR vervielfältigt.

Als Expressionsvektor wurde der retrovirale Vektor pMP71 verwendet. Die erfolgreiche Ligation der drei DNA-Fragmente wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau mit den Endonukleasen Notl und EcoRI überprüft. Das fertige Konstrukt wurde durch *Cycle*-Sequencing der Firma MWG Operon auf seine Richtigkeit überprüft. Wir konnten somit erfolgreich die drei verschiedenen FcγRIIIa-Polymorphismen in jeweils retrovirale Expressionsvektoren klonieren, die daraufhin für die Expression in verschiedenen T-Zellarten genutzt wurden.



Abbildung 5: Restriktionsverdau der Vektoren für FcγRIIIa -158V/48L, -158F/48V und -158V/48H. Die Insert-DNA der FcγRIIIa-Varianten wurde durch die Restriktionsenzyme EcoRI und NotI aus dem Expressionsvektor pmp71 geschnitten. Zur Analyse wurden Vektor und *Insert* im Agarosegel aufgetrennt.

4.3 Expression des FcyRIIIa auf T-Zelllinien

4.3.1 Nachweis der Expression des FcyRIIIa auf murinen T-Zellen

Die Expression der FcyRIIIa-Varianten wurde zunächst in murinen B3Z-Zellen getestet, deren einfache und stabile Transduktion in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert ist. Die verschiedenen Polymorphismen des FcyRIIIa (CD16) wurden nach oben genanntem Protokoll retroviral in die Zellen eingeschleust. Durch retrovirale T-Zell-Transduktion konnten vergleichbare mittlere Expressionslevels für CD16 von mehr als 97% für die verschiedenen FcyRIIIa-Polymorphismen erreicht werden (Abbildung 6). Die Expression auf der Zelloberfläche war stabil und konnte für mehrere Zellgenerationen gehalten werden.





4.3.2 Nachweis der Expression des FcγRIIIa Rezeptors in humanen T-Zellen

Jurkat-Zellen, eine humane T-Zell Lymphomzelllinie, wurden mit retroviralen Überstände der Verpackungszelllinie Phoenix A transduziert. Nach Isolation der FcyRIIIa-tragenden T-Zellen durch CD16-Mikro-*Beads* konnte durch FACS-Färbung mit anti-CD16 Antikörpern eine Expressionsstärke von über 90% für FcyRIIIA-158F/48L, FcyRIIIA-158V/48L und FcyRIIIA-158V/48H erreicht werden (Abbildung 7). Diese Expression erlaubte es uns, die nun CD16-positiven Jurkat T-Zellen in Funktionalitätsversuchen einzusetzen.



Abbildung 7: Transduktionseffizienzen von Jurkat T-Zellen für FcqRIlla-Polymorphismen nach magnetisch aktivierter Zellsortierung. $2 \times 10^5 - 10^6$ Jurkat-Zellen wurden mit einem APC markierten anti-human CD16 Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert und zweimal gewaschen. In der FACS Analyse konnten im Vergleich zur untransduzierte Kontrolle für den FcqRIIIA-158F/48L Polymorphismus, den FcqRIIIa 158V/48L Polymorphismus; und den FcqR-IIIA 158V/48H – Polymorphismus Transduktionseffizienzen von über 90% erreicht werden (blaue Linie: APC antihumanes CD16 Antikörper, graue Fläche: Isotypkontrolle). Dargestellt ist die Zahl der mit CD16 markierten Zellen. Jeder Graph ist ein repräsentativ für Triplikate einer Färbung.

4.4 Untersuchung der Bindungskapazität der FcyRIIIa-Polymorphismen zu Cetuximab

Als nächstes wollten wir nachvollziehen, ob die Expression eines 158V- oder 158F- bzw. 48L- oder 48H-Polymorphismus des FcyRIIIa mit einer erhöhten Affinität zu Cetuximab einhergeht. Die Bindungseigenschaften der FcyRIIIa-Varianten wurden in durchflusszytometrischen Analysen untersucht. FcyRIIIa-tragende B3Z T-Zellen mit vergleichbarer Transduktionseffizienz wurden zusammen mit aufsteigend titrierten Dosen von Cetuximab inkubiert. Die Höhe der Konzentration an Cetuximab, die zu einer Bindung an den jeweiligen FcyRIIIa-Rezeptor führte haben wir als Hinweis auf die Bindungsaffinität des Rezeptorpolymorphismus zum Antikörper gewertet. Hierbei stellten sich unterschiedliche Bindungseigenschaften der verschiedenen Rezeptoren dar.

Untransduzierte Zellen konnten kein Cetuximab binden (Abbildung 8A). Auch im Fall des 158F-FcγRIIIa war in Konzentrationen von 0,1 - 10 µg/ml keine Bindung über die Fluoreszenz des Antikörpers gegen Cetuximab nach mehrfachen Waschgängen zu detektieren. Erst nach Inkubation mit Cetuximab in einer Konzentration von 50 µg/ml konnte eine Bindung an den 158F-FcγRIIIa über den sekundären Antikörper festgestellt werden, wobei die Fluoreszenzintensität hier mit 22% deutlich niedriger war als die der beiden 158V/V Polymorphismen (Abbildung 8B).

An 158V/48H-FcyRIIIa gebundenes Cetuximab konnte in Konzentration von 1 μ g/ml bereits minimal und in Konzentrationen von 10 μ g/ml zu 20% detektiert werden. In einer Konzentration von 50 μ g/ml konnten 158V/48H-FcyRIIIa T-Zellen als zu 70% mit Cetuximab besetzt gezeigt werden. Eine noch sensiblere Bindung konnte auf T-Zellen, die den 158V/48L-FcyRIIIa trugen, festgestellt werden. Hier konnte rezeptorgebundenes Cetuximab schon in Konzentration von 1 μ g/ml detektiert werden (Abbildung 8C). In einer Konzentration von 10 μ g/ml führte dies zu einem deutlichen *Shift* in der Fluoreszenzintensität um 85% (Abbildung 8C).

Die frühere und stärkere Fluoreszenz der beiden Valin tragenden Polymorphismen nach Inkubation mit Cetuximab ließ uns vermuten, dass ein Valin an Stelle 158 des FcγRIIIa eine höhere Bindungsaffinität an Cetuximab vermittelt. Der FcγRIIIa-158V48L-Polymorphismus schien dem FcγRIIIa-158V48H-Polymorphismus gegenüber Cetuximab schon in geringeren Konzentrationen zu binden.


Abbildung 8: Die FcγRIIIa-Rezeptorpolymorphismen verfügen über unterschiedliche Bindeaffinitäten zu Cetuximab. 2 x 10⁵ - 10⁶ T-Zellen der murinen T Zellinie B3Z wurden mit Cetuximab in Konzentrationen von 0,001 bis 10 µg/ml für 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers wurden die Zellen mit einem sekundären FITCmarkierten Antikörper gegen humanes IgG gefärbt. Die Zellen wurden daraufhin mit 0,25% Formaldehydlösung fixiert. Verwendet wurden untransduzierte T-Zellen (A), sowie mit den FcγRIIIa--Polymorphismen 158F/48L (B), 158V/48L (C) und 158V/48H (D) transduzierte Zellen. Die Fluoreszenzintensität der mit Cetuximab und anti-human IgG-markierten Zellen (farbig) wurde gegen die nur mit Sekundärantikörper angefärbte Isotypkontrolle (grau) aufgetragen. Dargestellt ist ein respräsentativer Datensatz aus drei Messungen und je eine Probe aus Triplikaten.

4.5 Feststellung von Tumorzelllyse in Kokulturen von FcγRIIIa T-Zellen und kolorektalen Tumorzelllinien

Durch die Expression des FcγRIIIa auf T-Lymphozyten und folgender Vernetzung mit der Tumorzelle durch Cetuximab erwarteten wir ein T-Zell-vermitteltes ADCC gegen Kolonkarzinomzellen. Um die Zytotoxizität der kombinierten Therapie mit FcγRIIIa-transduzierten T-Zellen und Cetuximab zu überprüfen wurden Kolonkarzinomzelllinien in Anwesenheit von Cetuximab in Kokultur mit FcγRIIIa-Rezeptor tragenden Jurkat T-Zellen gegeben. Durch Bindung von Cetuximab (F_{ab}-Teil) an den EGFR-Rezeptor der Kolonkarzinomzelle und Erkennung des F_c-Teils des Antikörpers durch den FcγRIIIa-Rezeptor sollte es zu einer Aktivierung der T-Zelle kommen.

Für die Zytotoxizitätsversuche wählten wir die KRAS-mutierte Zelllinie HCT116 sowie die BRAFmutierte Zelllinie Colo205. HCT116-Zellen konnte durch T-Zellen, die FcγRIIIa-Varianten trugen, effektiv lysiert werden (Abbildung 9A). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Zytotoxizität über ADCC durch T-Zellen, die einen FcγRIIIa mit Valin an Stelle 158 trugen gegenüber solchen mit Phenylalanin. Eine maximale Zytotoxizität durch ADCC konnte durch T-Zellen ausgestattet mit dem 158V/48H FcγRIIIa in einem E:T-Verhältnis von 20:1 mit fast 40% erreicht werden. Auch T-Zellen mit 158V/48L-FcγRIIIa-Polymorphismus konnten eine spezifische Lyse der HCT116-Zellen von 20% in einem Effektor- zu Targetzellverhältnis von 10:1 erreichen.

Dem gegenüber bewirkten mit einem 158F/48L-FcγRIIIa ausgestatte T-Zellen nur eine bis zu 10%prozentige Lyse in einem E:T-Verhältnis von 20:1. Der 158V-FcγRIIIa scheint also neben einer höheren Antikörperbindung auch für ein stärkeres ADCC durch Cetuximab verantwortlich zu sein. Im Falle der Tumorzelllinie Colo205 wurde eine sehr geringe, nicht signifikante Lyse durch alle drei verschiedenen FcγRIIIa-Varianten beobachtet (Abbildung 9B). Dies lässt vermuten, dass möglicherweise weitere Eigenschaften der Zellen einen Einfluss auf die Cetuximab-vermittelte ADCC haben.



Abbildung 9: Untersuchung von Cetuximab-vermitteltem ADCC durch FcyRIIIa T-Zellen auf kolorektale Tumorzelllinien. HCT116- und Colo205-Zellen wurden mit 158V/48L- ,158F/48L- und 158V/48H FcyRIIIa T-Zellen in Effektor- zu Zielzellverhältnissen von 1:1 bis 1:20 mit 10 µg/ml Cetuximab für 6 Stunden inkubiert und die LDH-Ausschüttung im Überstand quantifiziert. Nach Abzug der spontanen LDH-Freisetzung von T-Zellen und Tumorzellen wurde die Zelllyse in Bezug auf die maximale LDH-Ausschüttung unter Zugabe von Triton X 0,1% dargestellt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM von Triplikaten einer Probe. Abgebildet ist ein repräsentativer Datensatz aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. *P < 0,05, **P < 0,01, ns bedeutet nicht signifikant.

4.6 Expression des FcyRIIIa auf primären humanen T-Zellen

In ersten Transduktionen nach einem in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten Protokoll konnten in aus Spender-PBMCs isolierten T-Zellen stabile Transduktionsergebnisse von 55% und 66% für die höher affinen 158V-FcyRIIIa-Polymorphismen (FcyRIIIa-158V48H und FcyRIIIa-158V48L) erreicht werden. Auf diese Weise transduzierte T-Zellen stehen somit in der Zukunft Funktionalitätsversuchen zur Verfügung.



Abbildung 10: Primäre humane T-Zellen können mit den höher affinen 158V-Varianten des FcγRIIIa ausgestattet werden. Durch retrovirale T-Zelltransduktion mit aus Transfektion von HEK293T-Zellen gewonnenen Virus können T-Zellen aus peripherem Spenderblut mit den höher affinen FcγRIIIa-158V/48L und FcγRIIIa-158V/48L ausgestattet werden. Dabei wurden Transduktionseffizienzen von 55-66% erreicht. Dargestellt ist die Zahl der mit CD16 markierten Zellen, jeder Graph ist ein repräsentativ für Triplikate einer Färbung.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden drei verschiedenen Polymorphismen des FcγRIIIa in murinen als auch humanen T-Zellen exprimiert. T-Zellen, die mit einem 158V-FcγRIIIa ausgestattet waren, haben in FACS-Bindungsversuchen eine höhere Bindungskraft an Cetuximab gegenüber solchen mit 158F-FcγRIIIa gezeigt. FcγRIIIa-tragende T-Zellen konnten in Kultur mit der Cetuximab-resistenten humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 eine signifikante Tumorzelllyse durch zellvermittelte Zytotoxizität bewirken und somit über ADCC die Antikörperresistenz durch die KRAS-Mutation im EGFR-Signalweg überwinden. Dabei zeigte sich ebenfalls eine deutlich stärkere zelluläre Zytotoxizität durch 158V-FcγRIIIa-tragende T-Zellen als diejenige durch 158F-FcγRIIIa-T-Zellen. Der höher affine 158V-FcγRIIIa-Rezeptor konnte auch in primären humanen T-Zellen in hohem Maße exprimiert werden.

5.1 Der Mutationsstatus bestimmt die Sensitivität von Kolonkrebszelllinien auf Cetuximab

Wir testeten die bereits gut charakterisierten humanen Kolorektalkarzinom-Zelllinien CaCo2, HCT116 und Colo205 auf ihre Sensitivität gegenüber Cetuximab. HCT116- und Colo205-Zellen, in denen die G13D-Mutation im KRAS-Gen sowie ein mutiertes PIK3CA in Exon 20 (Benvenuti et al. 2007, Jhawer et al. 2008) bzw. die BRAF-Mutation (Di Nicolantonio et al. 2008) nachgewiesen wurden, zeigten unter alleiniger Behandlung mit Cetuximab nur eine geringfügige Herabsetzung in ihrer Viabilität durch den EGFR-Antikörper (Abbildung 8A und B). Dies bestätigt die zuvor gemachte Beobachtung, dass die V600E BRAF-Mutation Colo205-Zellen hochgradig resistent gegen die Behandlung mit Cetuximab macht (Di Nicolantonio et al. 2008). Ebenso wurden für HCT116-Zellen in mehreren Studien kein Ansprechen gegenüber dem durch Cetuximab hervorgerufenen Zellzyklusarrest festgestellt (Ashraf et al. 2012, Jhawer et al. 2008, Shigeta et al. 2013). Dem Gegenüber besitzt die Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 einen KRAS-Wildtyp (Shigeta et al. 2013) und keine weiteren aktivierenden Mutationen im EGFR-Signalweg. Daher zeigte sich diese in unseren Versuchen auch als empfänglich für eine EGFR-Rezeptorblockade durch den Antikörper (Abbildung 8C). Ein starkes Ansprechen von CaCo2-Zellen auf die Signalweginhibition durch Cetuximab wurde schon durch Shigeta et al. und Jhawer et al. beobachtet (Jhawer et al. 2008, Shigeta et al. 2013). Auch in vivo haben mehrere Studien gezeigt, dass das Vorhandensein eines KRAS-Wildtyps eine Voraussetzung für den Therapieerfolg von Cetuximab ist. Dennoch werden KRAS-Wildtyp Patienten ebenfalls in nicht geringer Zahl nicht auf die Antikörpertherapie ansprechen (De Roock et al. 2011). Unsere in vitro Ergebnisse bestätigten somit die klinische Feststellung, dass kolorektale Tumorzellen, die eine Mutation im EGFR-Signalweg tragen, der direkten, proliferationsinhibierenden Wirkung von Cetuximab nur minimal zugänglich sind (De Roock et al.

2011). Neben aktivierenden Mutationen im KRAS-Gen kann auch eine Mutation im BRAF-Gen für eine Resistenz gegenüber Cetuximab verantwortlich sein (Benvenuti et al. 2007). Trotz des Nachweises weiterer, prognostisch relevanter Mutationen im EGFR-Signalweg ist der KRAS-Status

der derzeit am besten etablierte Faktor, um die Sensitivität eines kolorektalen Tumors auf Cetuximab vorauszusagen (Walther et al. 2009). Daher wird dieser Status vor einer Cetuximab-Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom standardmäßig getestet. Allerdings haben Studien gezeigt, dass bei bestimmten Patienten trotz des Vorliegens einer KRAS-Mutation ein Therapieansprechen auf Cetuximab vermerkt werden konnte (Bibeau et al. 2009). Dieser Effekt scheint jedoch nicht durch die Signalwegblockade durch Cetuximab, sondern vielmehr durch die Fähigkeit des Antikörpers, mit seinem F_c-Teil den FcγRIIIa-Rezeptor auf Immunzellen zu aktivieren, zurückzuführen zu sein. Diese Beobachtung stellte die Grundlage für den Einsatz des höher affinen 158V/V-FcγRIIIa Rezeptoren in T-Zellen um die Resistenz gegenüber Cetuximab durch aktivierende Mutationen im EGFR-Signalweg zu durchbrechen.

5.2 Einfluss der FcyRIIIa-Rezeptorpolymorphismen auf die Bindeaffinität zu Cetuximab

Durchflusszytometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass humanes IgG1 stärker an 158V/V-FcγRIIIa als an 158F/F-FcγRIIIa tragende NK-Zellen bindet (Koene et al. 1997, Vance et al. 1993, Wu et al. 1995). Für Rituximab wurde bereits überzeugend nachgewiesen, dass das 158V-Allel des FcγRIIIa eine höhere Bindungsaffinität als das 158F-Allel besitzt und mit einem stärkeren ADCC durch NK-Zellen korreliert (Dall'Ozzo et al. 2004, Hatjiharissi et al. 2007). Obwohl in retrospektiven Analysen ein möglicher Einfluss des FcγRIIIa-F158V-Polymorphismus auf das Ansprechen auf Cetuximabtherapie vermutet wurde, waren die Ergebnisse bis dato widersprüchlich (Mellor et al. 2013). Wir wollten in unseren Versuchen dem Effekt der FcγRIIIa-Rezeptorvarianten auf die Bindungsaffinität zu Cetuximab nachgehen, um Anhaltspunkte für die Behandlung des Kolonkarzinoms aufzudecken. Auf murinen T-Zellen haben wir vergleichend den 158V-FcγRIIIa mit jeweils einem 48L- und 48H-Polymorphismus, sowie den 158F/48L-Polymorphismus auf diese Fähigkeit hin verglichen.

Unsere Daten zeigten eine deutlich unterschiedliche Cetuximab-Bindung zwischen Rezeptoren, die ein Valin oder Phenylalanin an Stelle 158 trugen. FcγRIIIa-Polymorphismen, die ein V an Stelle 158 trugen, haben Cetuximab in deutlich geringeren Konzentrationen des Antikörpers gebunden, während eine sehr hohe Konzentration notwendig war, um eine Bindung an 158F/48L-FcγRIIIa T-Zellen zu detektieren. Wir bestätigen somit auch für Cetuximab die Beobachtungen, dass der Aminosäurenaustausch zu Valin an Stelle 158 die Bindekraft des FcγRIIIa zu IgG1 erhöht (Koene et al. 1997, Vance et al. 1993, Wu et al. 1995). Zudem konnten wir auch einen dosisabhängigen Unterschied in der Bindeaffinität zwischen den multivarianten Formen des FcγRIIIa-48H und -48L feststellen. T-Zellen, die den FcγRIIIa-158V/48L trugen, haben Cetuximab bereits in geringeren Konzentrationen des Antikörpers gebunden, als solche mit 158V/48H-Polymorphismus.

Die Bedeutung dieses eher marginalen Unterschiedes in den vorliegenden Experimenten ist eher unklar. Während für den 158V-FcyRIIIa-Polymorphismus eine stärkere Affinität zu IgG1-Antikörpern

bereits belegt ist, ist die Datenlage betreffend des FcyRIIIa-48L/H/R-Polymorphismus weniger klar. In einer Studie von de Haas et al. zeigten der FcyRIIIa-48R und FcyRIIIa-48H auf NK-Zellen eine höhere Bindekapazität von humanem IgG1 im Vergleich mit dem FcyRIIIa-48L-Polymorphismus (de Haas et al. 1996, de Vries et al. 1996). Später wurde aber geschlussfolgert, dass die beobachteten spender-abhängigen Unterschiede in der IgG-Bindung nicht von dem Aminosäureaustausch an Stelle 48, sondern von dem Vorhandensein von Valin an Aminosäureposition 158 herrühren (Koene et al. 1997). Es zeigte sich, dass die beschriebenen FcyRIIIa-48L/L-positiven NK-Zell-Spender alle gleichzeitig homozygot für FcyRIIIa-158F waren, und daher bereits eine niedrige IgG-Bindung aufgewiesen haben können. Im Gegensatz dazu waren die FcyRIIIa-48L/R- und 48L/H-positiven Spender-NK-Zellen auf einem oder zwei FcyRIIIa-Allelen 158V-positiv (Koene et al. 1997). Auch die beschriebene Struktur des FcyRIIIa spricht eher gegen einen Einfluss des FcyRIIIa-48H Polymorphismus auf die Antikörper-Bindung. Die membranproximale Domäne (D2) des FcyRIIIa, welche den 158V/F-Polymorphismus trägt, wird als IgG-Bindungsdomäne in FcyRs angenommen (Shields et al. 2001). Daher ist eine Beeinflussung durch den 48-H/L/R-Polymorphismus, der auf der membranfernen ersten IgG-ähnlichen-Domäne liegt, unwahrscheinlich. In Co-Kristallisierungen konnte nachgewiesen werden, dass die den 158V/F-Polymorphismus tragende zweite IgG-ähnliche Domäne des Rezeptors direkt mit der *Hinge Region* am F_c-Teil des Antikörpers interagiert, während die erste IgG-ähnliche Domäne (D1) keinen Kontakt herstellt (Radaev et al. 2001, Sondermann et al. 2000).

Ein weiterer möglicher Grund für unterschiedliche Bindung könnte die Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen darstellen. Basierend auf Titrationen von IgG-Bindung auf NK-Zellen von IgG niedrig- und stark-bindenden Individuen schlussfolgerte Vance et al., dass die absolute Zahl an FcyRIIIa-Rezeptoren mehr als die FcyRIIIa-Affinität zu IgG1-Antikörpern für die Unterschiede in der IgG-Bindung verantwortlich ist (Dall'Ozzo et al. 2004). Im Gegensatz dazu beobachteten Wu et al. ähnliche Fluoreszenzintensitäten mit verschiedenen CD16-Antikörpern auf NK-Zellen von V/V- und F/F-Spendern und folgerten daraus ein gleiches Level an FcyRIIIa auf den Zellen, wonach der 158 F/V-Polymorphismus die Affinität beeinflussen müsste (Wu et al. 1995). Wir konnten ebenfalls in eine vergleichbare Expressionsstärke der verschiedenen Rezeptorvarianten auf der T-Zelloberfläche nachweisen, wonach wir nicht von unterschiedlichen Rezeptorzahlen zwischen den verschiedenen FcyRIIIa-T-Zellen ausgehen. Es muss jedoch festgehalten werden, dass das sekundäre Anfärben von FcyRIIIa-gebundenem Cetuximab durch einen humanen IgG-Antikörper nur einen indirekten Rückschluss auf die Affinität erlaubt. Die Arbeitsgruppen um Dall'Ozzo und Wu haben dem Gegenüber die Affinität der FcyRIIIa-Rezeptoren zu Rituximab indirekt über die Fähigkeit von Rituximab gemessen, einen CD16-Antikörper aus der Bindung an den FcyRIIIa zu verdrängen (Dall'Ozzo et al. 2004, Wu et al. 1995). Diese und andere (z.B. ELISA-) Nachweismethoden könnten ebenfalls verwendet werden, um unser Ergebnis zu verifizieren. Weitere Studien wären allerdings notwendig, um die Aussagekraft unserer Daten zur

Empfindlichkeit zwischen an Stelle 48 verschiedentlichen Varianten der FcγRIIIa zu stützen. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse eindeutig, dass FcγRIIIa-Rezeptoren, die einen 158V/V-Allotyp haben, Cetuximab stärker und in geringeren Konzentrationen binden, womit dieser als deutlich affiner gegenüber dem Antikörper angenommen werden kann.

5.3 FcyRIIIa-T-Zellen können kolorektale Karzinomzellen trotz aktivierender Mutationen zerstören

Die tatsächliche Rolle von ADCC in der anti-tumoralen Aktivität von Cetuximab bei Kolonkarzinompatienten ist noch nicht komplett erforscht. Verglichen mit der Fähigkeit des Antikörpers, die EGFR-vermittelte Signalkaskade zu unterbinden, sind nur wenige Informationen zum Cetuximab-vermittelten ADCC im kolorektalen Karzinom verfügbar. Grundsätzlich ist Cetuximab fähig, ADCC hervorzurufen. Den stärksten Hinweis dafür, dass Cetuximab über immunvermittelte Mechanismen antitumoral wirkt, lieferte die Beobachtung, dass eine spezifische polymorphe Variante im FcyRIIIa mit einem besseren Überleben von mKRK-Patienten, die Cetuximab erhalten, zu korrelieren scheint (Correale et al. 2012). Außerdem wurde klinisch gezeigt, dass die KRAS-Mutation Tumorzellen nicht komplett resistent gegen ADCC macht. mAb, deren F_c-Teil dahingehend verändert wurde, dass sie stärker an FcyRIIIa binden, können eine Tumorlyse auch bei KRAS-mutierten Tumoren über ADCC möglich machen (Correale et al. 2012, Schlaeth et al. 2010).

Wir testeten humane kolorektale Tumorzellen, in denen die KRAS- und PIK3CA-Mutation bzw. die BRAF-Mutation nachgewiesen wurde, auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Cetuximab-vermitteltem ADCC durch FcγRIIIa-exprimierende T-Zellen. Keine der Zelllinien wurde durch Cetuximab alleine in ihrer Proliferation inhibiert. Die Kokultur von CD16-positiven T-Zellen mit HCT116-Zellen trotz aktivierender Mutationen im EGFR-Signalweg konnte eine signifikante Tumorzelllyse durch ADCC bewirken. Dabei war der 158V-FcγRIIIa mit sowohl einem 48H- als auch dem 48L-Polymorphismus dem 158F-FcγRIIIa deutlich überlegen. Unsere Ergebnisse stimmen insofern mit Studien überein, in denen mittels anderer IgG1-Antikörper wie Rituximab und Trastuzumab über das FcγRIIIa 158V/V-Allel auf NK-Zellen eine stärkere antitumorale Aktivität durch ADCC bewirkt wurde, als in Anwesenheit des F/F-Allels (Musolino et al. 2008, Weng et al. 2010).

Im Falle des kolorektalen Karzinoms besteht in der Literatur noch Uneinigkeit darüber, welcher Polymorphismus des FcyRIIIa ein verbessertes Ansprechen auf die Cetuximabtherapie übermittelt. Bibeau et al. stellten fest, dass Patienten, die ein Valin an Stelle 158 des FcyRIIIa trugen, unabhängig von dem KRAS-Mutationsstatus auf Cetuximab ansprachen (Bibeau et al. 2009). Ebenso gibt es aber Studien, die keine Unterschiede im Progressions- und Gesamtüberleben von Patienten mit FcyRIIIa-158F oder 158V Allel auf NK-Zellen feststellen konnten (Paez et al. 2010). Jedoch hat auch eine Studie einen gegenteiligen Effekt dargestellt, indem sie den FcyRIIIa-158F/F-

Polymorphismus als vorteilhaften Rezeptor herausstellte (Zhang et al. 2007). Unsere Daten stehen also in Konflikt zu den *in vivo* Beobachtung von Zhang et al., welche den FcγRIIIa-158V/V-Polymorphismus mit niedrigeren Ansprechraten und vermindertem Überleben unter Cetuximab-Monotherapie bei Patienten mit metastatischen Kolonkarzinom assoziierten (Zhang et al. 2007). Die Untersuchungen von Zhang et al. fanden allerdings nur eine marginale Korrelation zu diesen Polymorphismen und konnten ihre Beobachtung in einer späteren Studie mit größerer Patientenzahl nicht verifizieren (Lurje et al. 2008). Ihr Bericht steht außerdem in Konflikt zu einer großen Zahl an *in vitro* Daten, die eine bessere Bindung des FcγRIIIa-158V/V-Rezeptors an IgG1-Antikörper aufzeigen (Cartron et al. 2002, Dall'Ozzo et al. 2004). Weitere Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnten ebenso keinen Einfluss oder einen nachteiligen Effekt des FcγRIIIa-F158V-Allels (Geva et al. 2015, Park et al. 2012) auf das progressionsfreie Überleben von mKRK-Patienten unter Cetuximab-Therapie feststellen (Pander et al. 2010). Insgesamt müssen die Daten der bisherigen *in vivo* Studien jedoch auch kritisch beurteilt werden, da sie häufig mit einer relativ geringen Patientenzahl nach heterogener Vorbehandlung und als retrospektive Analyse durchgeführt wurden.

Kürzlich konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der ex vivo Cetuximab-vermittelten zellulären Lyse einer Kolonkarzinomzelllinie durch aktivierte PBMCs von mKRK-Patienten mit deren Gesamtüberleben gefunden werden. Für Patienten mit dem FcyRIIIa-158V-Allel war dieser Effekt gegenüber dem 158F-Allel ausgeprägter und stellte es so als prognostischen Faktor heraus (Trotta et al. 2016). Lopez-Albeitero et al. korrelierten die Expression des FcyRIIIa-158V-Allels ebenfalls deutlich mit der Cetuximab-induzierten ADCC-Aktivität, Degranulation und Zytokinsekretion durch NK-Zellen gegenüber Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches (Lopez-Albaitero et al. 2009). Auch unsere in vitro Daten geben einen klaren Hinweis darauf, dass der 158V-FcyRIIIa dem 158F-FcyRIIIa in der Bindung an Cetuximab und in der Vermittlung von ADCC überlegen ist. Zusätzlich konnten wir durch FcyRIIIa-48H-tragende T-Zellen eine prozentual minimal stärkere Tumorzelllyse als die durch den 48L-Polymorphismus-tragenden T-Zellen vermerken. Ein solcher Unterschied in der ADCC-Vermittlung könnte klinisch relevant sein, da das 48H-Allel im Vergleich zu dem 48L- oder 48R-Allel nur bei einer geringen Zahl an Patienten festgestellt wurde (de Haas et al. 1996, Jawahar et al. 1996). Unsere Beobachtung ist allerdings auch kritisch zu hinterfragen, da die durch den FcyRIIIa-H48 vermittelte Lyse nicht signifikant höher als die durch den FcyRIIIa-48L war. Somit können diese Unterschiede auch durchaus durch minimale Schwankungen in Zellzahl und Zellviabilität erklärt werden. In der Literatur wurde der FcyRIIIa-48L/L oder -48L/H-Genotyp noch nicht wesentlich erforscht. Bei Patienten mit Morbus Waldenström, die einen FcyRIIIa-48L/H-Genotyp anstelle eines FcyRIIIa-48L/L oder -48L/R-Genotyp auf NK-Zellen trugen, berichtete die Arbeitsgruppe um Treon et al. von besserem Ansprechen auf Rituximab-Therapie (Treon et al. 2005). Jedoch konnte auch dieser Zusammenhang nicht als statistisch signifikant herausgestellt werden. Hier vermutete die Gruppe, dass die vorbeschriebene und auch in dieser Studie

beschriebene Verknüpfung zwischen dem 48L/H-Allel und dem 158V-Allel für die unterschiedlichen Ergebnisse ausschlaggebend war. Die Bindeaffinität zu Cetuximab des 158V48L-Polymorphismus war in unseren Vorversuchen unterlegen. Eine funktionelle Korrelation zwischen dem individuellen Level an IgG-Bindung an den FcyRIIIa und dem Level von ADCC gegen Zielzellen war hier erwartet worden (Vance et al. 1993). Die von uns beobachtete Diskrepanz könnte möglicherweise durch eine mangelnde Sensitivität der FACS-Bindungsversuche oder der Messung von Tumorzelllyse durch die LDH-Ausschüttung erklärt werden. Im Vergleich zu dieser Beobachtung zeigte sich der Unterschied in der Zytotoxizität von T-Zellen auf opsonierte Kolonkarzinomzellen durch den FcyRIIIa-158V gegenüber dem FcyRIIIa-158F jedoch als statistisch signifikant. Unsere Daten sprechen demnach insgesamt für ein größeres Potenzial von FcyRIIIa-158V-transduzierten T-Zellen, ADCC durch Cetuximab zu vermitteln. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Cetuximab durch Einsatz von 158V/V-FcyRIIIa-T-Zellen auch gegenüber KRAS-mutierten Tumoren durch seine Vermittlung von ADCC wirksam sein kann. Die 158V-FcyRIIIa-positiven T-Zellen konnten die KRAS-mutierte KRK-Zelllinie HCT116, die durch Cetuximab allein nicht in ihrer Proliferation gehemmt werden konnte, effektiv lysieren. Ziel weiterer Arbeiten wird es sein, die von der T-Zelle ausgeschütteten zytotoxischen und stimulatorischen Faktoren zu untersuchen, die zu der beobachteten Tumorzelllyse führen.



Immunstimulatorische Faktoren

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Therapiekonzepts von Cetuximab-vermittelter zellulären Lyse des KRAS-mutierten Kolonkarzinoms mittels FcγRIIIa tragenden T-Zellen durch ADCC. Durch Vernetzung des EGFR mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab werden über den FcγRIIIa transduzierte T-Zellen aktiviert, welche die Tumorzelle durch Ausschüttung zytotoxischer Faktoren lysiert. Durch dieses Cetuximab-mediierte ADCC mittels T-Zellen können auch KRAS-mutierte Kolonkarzinomzellen angegriffen werden.

5.4 FcyRIIIa-CAR-T-Zellen

Zeitgleich mit unserer Arbeit wurden mehrere chimäre Antigenrezeptoren auf T-Zellen entworfen, die anstelle der Antigenbindungsstelle eines Antikörpers den FcγRIIIa mit intrazellulären Signaldomänen kombinieren. Um eine längere Lebensdauer und stärkere Proliferation der resultierenden, gentechnisch veränderten T-Zellen zu bewirken, tragen diese zusätzlich zur extrazellulären Domäne des FcγRIIIa-Rezeptors zellproliferations-stimulatorische und signaltransduzierende Ketten des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes.

Ein erster, gegenüber herkömmlichen chimären Antigenrezeptoren untypischer, FcγRIIIa-CAR zusammengesetzt aus der extrazellulären Domäne von FcγRIIIa-158V und der intrazellulären Signaldomäne des FcεRIγ-Komplexes wurde von der Arbeitsgruppe um Clemenceau et al. in CD3⁺-T-Zellen exprimiert. Zellen, die diesen Rezeptor trugen, konnten *in vitro* eine zelluläre Zerstörung von Rituximab-gebundenen CD20⁺-Lymphomzellen durch ADCC bewirken (Clemenceau et al. 2006). In einem ähnlichen Ansatz haben Ochi et al. einen FcγRIIIa-CD3ζ-Rezeptor auf T-Zellen in einem murinen Modell des B-Zelllymphoms getestet. Auf T-Zellen exprimiert konnten diese in immundefizienten Mäusen CD20⁺-Lymphomzellen durch Rituximab-vermittelte zelluläre Zytotoxizität zerstören. Auch im Vergleich zu infundierten NK-Zellen konnte eine effektivere und länger andauernde Suppression des Tumorwachstums gezeigt werden (Ochi et al. 2014). In *in vitro* Versuchen haben die FcγRIIIa-CD3ζ-T-Zellen über Rituximab, Trastuzumab und Mogamulizumab ADCC gegen CD20+-Lymphomzellen, Her2/neu+-Brustkrebszellen und T-Zellleukämiezellen hervorrufen können und zeigten IFNγ und IL-2 Sekretion, Proliferation und Ausschüttung lytischer Granula. Durch Steigerung der Antikörperdosis konnte die T-Zelltoxizität erhöht werden sowie durch einen anti-FcγRIIIa-Antikörper gemindert werden (Ochi et al. 2014).

Mittlerweile haben zwei Arbeitsgruppen einen FcγRIIIa-CAR der zweiten Generation, also mit zwei aneinandergereihten kostimulatorischen Signaldomänen erstellt. Die Gruppe um Kudo et al. klonierte einen FcγRIIIa-BB-CD3ζ-CAR, der die extrazelluläre Domäne des höheraffinen FcγRIIIa-158V über das transmembrane CD8α mit der CD3ζ-Kette und 4.1BB verbindet. Sowohl *in vitro* und *in vivo* haben T-Zellen über diesen Rezeptor B-Zell-Lymphomzellen in Anwesenheit von Rituximab zerstören können. Die Aktivierung von FcγRIIIaV-BB-CD3ζ bewirkte die Expression des IL-2 Rezeptors auf der Zelloberfläche und die Exozytose von zytotoxischen Granula durch die T-Lymphozyten sowie eine deutliche Proliferation der Zellen (Kudo et al. 2014). Die Effektivität dieser Zellen konnte auch gegenüber Magentumorzellen und Mammakarzinomzellen in Anwesenheit spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. In einem Xenograft-Modell des B-Zelllymphoms mit immundefizienten Mäusen verhinderte der adoptive Transfer der FcγRIIIa-BB-CD3ζ-CAR-T-Zellen das Tumorwachstum vollständig. In allen fünf Mäusen, die mit Rituximab in Kombination mit CD16V-BB-ζ-T-Zellen behandelt wurden, wurde ein stabiler Rückgang der Tumormasse nach 120 Tage nach der Injektion verzeichnet. Eine ähnliche, partielle Remission wurde in einem Modell des

Neuroblastoms beobachtet (Kudo et al. 2014). Ein ähnlicher Zweitgenerations-CAR des FcγRIIIa der Gruppe von D'Aloia und Kollegen verknüpft den Rezeptor mit der Gelenks- und Transmembranregion von CD8α, der CD3ζ-Kette des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes und dem kostimulatorischen CD28. T-Zellen der murinen T-Zellhybridomzelllinie MD45 wirkten trotz fehlender Exozytosefähigkeit von Granzym und Perforin mithilfe des FcγRIIIa-CD28-CD3ζ-CAR gegenüber Rituximab-benetzten Raji-Lymphomzellen zytotoxisch (D'Aloia et al. 2016). Neben der Ausschüttung von Interleukin-2 wurde eine Fas-Liganden-vermittelte Lyse der Zielzellen nachgewiesen. Dies ist ein wichtiges Fakt, da die Granzym-Ausschüttung von T-Zellen in Tumoren häufig vermindert ist (Radoja et al. 2001). FcγRIIIa-T-Zellen können somit sowohl Granula-abhängig als auch -unabhängig zytotoxisch wirken (Caratelli et al. 2017).

Das kürzliche Interesse am FcqRIIIa und dessen Expression auf T-Zellen ist erklärlich, denn das Konzept kombiniert zwei erfolgreiche Konzepte: die die Antikörperwirkung über ADCC, die von der HLA-Präsentation unabhängig ist, und die Zytotoxizität von genetisch veränderten T-Zellen. FcqRIIIa-CAR- und FcqRIIIa-T-Zellen teilen mit CAR-T-Zellen den Vorteil, dass sie HLA-unbegrenzt zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, deren HLA-I-Antigenprozessierung gestört ist. Dennoch unterscheiden sich die beiden Prinzipien grundsätzlich. Bisher ist die Anwendbarkeit von CAR T-Zelltherapie mitunter dadurch begrenzt, dass die Herstellung großer Mengen an CAR-T-Zellen gegen verschiedene Tumorantigene mit großem Aufwand und Kosten verbunden ist (Kalos et al. 2013). Dem gegenüber könnten FcqRIIIa-transduzierte T-Zellen von Vorteil sein, da sie, solange TAA-spezifische Antikörper mit der benötigten Spezifität vorhanden sind, verschiedene Tumorzellen angreifen können (Caratelli et al. 2017). Da fast alle derzeit in der Tumortherapie gebräuchlichen Antikörper über ADCC wirken, können so T-Zellen mit nur einem einzigen Rezeptor verschiedene Tumore und verschiedene Antigene eines Tumors angreifen (Ochi et al. 2014).

Eine weitere Limitierung von CAR-T-Zellen stellen überschießende Immunreaktionen in Form eines *"cytokine-storms*" dar, die in ersten Studien nach Transfusionen aktivierter T-Zellen beobachtet wurden (Morgan et al. 2010). Diese entstehen durch den Zellzerfall nach Tumorzelllyse, aber auch durch die gewisse sogenannte *on-target / off-tumor*-Toxizität, die bei jedem gegen ein Eigenantigen gerichteten mAk in unterschiedlichem Ausmaß problematisch wird. Auch FcγRIIIa-T-Zellen oder FcγRIIIa-CAR-T-Zellen richten sich gemäß des verwendeten mAk gegen Antigene auf normalen Geweben. Da ihre Funktion jedoch über die Erkennung von Immunkomplexen abläuft, ist sie durch Hinwegnahme oder Zufuhr des Antikörpers steuerbar. Zusätzliche Sicherheit entsteht dadurch, dass Antikörper gemäß ihrer Pharmakokinetik verstoffwechselt werden und nach einer gewissen Zeit aus dem System verschwinden. Die Toxizität hängt damit von Frequenz der Gabe und der verwendeten Dosis ab. Die Erwägung, dass freie Immunglobuline im Serum mit der Bindung an FcγRIIIa-CARs konkurrieren könnten, wurde durch die Arbeitsgruppe von Kudo bereits wiederlegt (Kudo et al. 2014). Sie konnten in ihren Versuchen zeigen, dass die Zytotoxizität der T-Zellen von

der Anwesenheit von opsonierten Zielzellen abhing und zusätzlich vorhandene, ungebundene Antikörper selbst in großer Zahl diese weder abschwächten noch eine unspezifische Zytotoxizität hervorriefen konnten. Der Einsatz von FcγRIIIa-T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunität, die Antikörper-Antigenkomplexe im Körper tragen, sollte jedoch kritisch gesehen werden (Caratelli et al. 2017).

5.5 Anwendung von FcyRIIIa-(CAR-)T-Zellen beim Kolonkarzinom

Bei Patienten mit mKRK wird aktuell mit zytostatischen Chemotherapie-Regimes in Kombination mit einer Antikörperbehandlung (Cetuximab) lediglich eine gewisse Überlebensverlängerung bewirkt. Der Beweis, dass eine gute Infiltration mit T-Zellen bei Patienten mit kolorektalen Tumoren für die Prognose im mKRK entscheidend ist (Galon et al. 2006) und zudem der Polymorphismus des FcγRIIIa auf NK Zellen einen Einfluss hat, brachten uns zur Annahme, dass mit ADCC-fähigen T-Zellen eine optimale Bekämpfung des Tumors möglich sein könnte. Unsere FcγRIIIa-T-Zellen haben zumindest *in vitro* das Konzept bewiesen, indem sie eine deutliche Lyse der KRAS-mutierten Kolonkarzinomzellen zeigen konnten. FcγRIIIa-T-Zellen mit Cetuximab in der Behandlung des Kolonkarzinoms zu kombinieren sollte demnach eine wirkungsvolle Therapie auch für Patienten mit Mutationen im EGFR-Signalweg darstellen können, für die es bis heute keine wirkungsvolle Antikörper-basierte Therapieoption gibt.

Für die Behandlung solider Tumoren wie dem Kolonkarzinom scheinen die CAR-T-Zell-Therapie und die Verabreichung von check point blockierenden Antikörper die derzeit vielversprechendsten Optionen. Die ermutigenden Ergebnisse der kürzlich veröffentlichten *in vivo* und *in vitro* Versuche mit FcγRIIIa-CARs haben zu Beginn von klinischen Trials über den adoptiven Transfer solcher Zellen geführt. FcγRIIIa-CAR-T-Zellen werden aktuell in Kombination mit Rituximab aktuell in klinischen Phase I Trials bei Patienten mit refraktärem oder wiederkehrendem CD20+-B-Zelllymphoms getestet (NCT02776813, NCT03189836; ClinicalTrials.gov). Präklinischen Studien weisen darauf hin, dass die CAR-T-Zell-Therapie durch Kombination mit checkpoint-blockierenden Antikörpern (anti-PD(L)-1 und anti-CTLA-4) potenziert wird. Die erstmalige Beobachtung, dass diese immunmodulatorischen Antikörper über FcγRIIIa eine Reduktion der Zahl an regulatorischen T-Zellen bewirken, macht ihre Anwendung zusammen mit FcγRIIIa-T-Zell-Therapie zusätzlich attraktiv. Unsere Daten, sowie auch die durch andere Gruppen gezeigte Tumorregression auch bei soliden Tumoren durch FcγRIIIa-CARs, sind vielversprechend für eine Anwendung des FcγRIIIa auch im Kolonkarzinom, welches eine gute Infiltration durch T-Zellen zeigt.

In unseren Versuchen war die reine Wildtypform des FcγRIIIa-Rezeptors ausreichend um eine Aktivierung der T-Zelle zu bewirken. Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen, die den extrazellulären Anteil des FcγRIIIa mit den transmembranen bzw. intrazellulären FcεRIγ- oder CD3ζ-Ketten verknüpften, haben wir in dieser Arbeit einen Wildtyp-FcγRIIIa exprimiert, der auch

transmembrane und intrazelluläre Signaldomänen besitzt. Dieser Wildtyp-FcγRIIIa bewirkt eine zur Lyse der Kolonkarzinomzellen führenden Aktivierung der T-Zellen. Wie diese Signaltransduktion abläuft und welche Faktoren ausgeschüttet werden haben wir bisher noch nicht untersucht. In einer frühen Arbeit stellten Wirthmueller et al. jedoch die γ-Kette des FcγRIIIa als notwendig für die Signaltransduktion und Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche heraus. Ihre Aktivierung hat zu einer ebenso starken T-Zellaktivierung wie die durch den TCR-CD3-Komplex geführt (Lanier et al. 1989, Wirthmueller et al. 1992). Die Gruppe um Lanier et al., die den Fcγ-Rezeptor mit als Erste beschrieben, zeigten, dass die im Rezeptor enthaltenen γ und ζ Signaldomänen der CD3ζ-Kette stark ähneln und mit dieser assoziieren (Kalos et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um D'Aloia et al. konnte dies ebenfalls nachweisen. In transient mit einem FcγRIIIa-CD3ζ-CAR ausgestatteten Jurkat-Zellen waren sowohl endogenes CD3ζ als auch das im CAR eingeschleuste CD3ζ phosphoryliert (D'Aloia et al. 2016). Wir gehen daher auch in unseren FcγRIIIa-Jurkat-T-Zellen und primären humanen FcγRIIIa-T-Zellen von einer Signaltransduktion über endogenes CD3ζ aus.

Während in der vorliegenden Arbeit zwar auch ohne Kombination mit zusätzlichen intrazellulären Signaldomänen (im Sinne eines CAR) T-Zellen über den FcγRIIIa aktiviert werden konnten, sind im Organismus die Lebensdauer und Zahl der T-Zellen entscheidend. In der klinischen Erfahrung, die die CAR-Technologie bis heute erbracht hat, sind zum Aufrechterhalten einer andauernden Tumorsuppression proliferations- und aktivierungsverstärkende Signaldomänen für einen wirkungsvollen Rezeptor nötig (Kudo et al. 2014). Die Gruppe um Kudo et al. konnte zeigen, dass der FcγRIIIa-BB-CD3ζ-CAR auf T-Zellen gegenüber anderen untersuchten FcγRIIIa-Rezeptoren mit nur einer signalstimulierenden Domäne (FcɛRIγ oder CD3ζ) in der bewirkten Proliferation, T-Zellaktivierung und Zytotoxizität überlegen war (Kudo et al. 2014). Eine Rezeptorvariante des extrazellulären Anteils des FcγRIIIa ohne intrazelluläre Signalkapazität wirkte ähnlich wie eine nicht transduzierten T-Zelle kaum zytotoxisch. Im Gegensatz dazu konnte in unserer Arbeit ein auch die intrazellulären, ITAM-besitzenden Signaldomänen tragender FcγRIIIa-Rezeptor auf T-Zellen *in vitro* durch Cetuximab vermittelte Zytotoxizität gegen Kolonkarzinomzellen hervorrufen. In Anbetracht unserer *in vitro* Ergebnisse ist in immunkompetenten Mäusen durch die Infusion solcher FcγRIIIa-T-Zellen und Cetuximab die zelluläre Abwehr eines implantierten Kolonkarzinoms zu erwarten.

6. Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Im Kolorektalkarzinom wird Cetuximab als anti-EGFR-Antikörper in der Therapie des Irinotecanrefraktären metastasiertem Tumorstadiums eingesetzt. Jedoch profitieren viele der Patienten nicht von dieser Antikörpertherapie, da KRAS- und andere aktivierende Mutationen im EGFR-Signalweg mit einer klinischen Resistenz gegen den Antikörper einhergehen. Allerdings wurde in den vergangenen Jahren bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom, die einen höher affinen Polymorphismus des FcγRIIIa-Rezeptors auf NK-Zellen trugen, verbesserte Ansprechraten berichtet. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob humane T-Zellen, die mit FcγRIIIa transduziert (genetisch verändert) wurden, Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität in Kolonkarzinomzelllinien bewirken können. Insbesondere interessierte uns der Einfluss von Mutationen im EGFR-Signalweg auf diesen therapeutischen Ansatz. Ferner sollte verglichen werden, inwiefern die verschiedenen, bekannten Polymorphismen des FcγRIIIa sich auf die Bindeaffinität zu Cetuximab und die Stärke der ADCC-vermittelten Lyse auswirken.

Die verschiedenen FcγRIIIa-Konstrukte konnten sowohl in murinen als auch humanen T-Zellen exprimiert werden. In FACS-Bindungsversuchen mit Cetuximab auf T-Zelllinien, die diese Rezeptoren exprimierten, zeigten 158V-FcγRIIIa T-Zellen eine höhere Bindungskraft an Cetuximab. In funktionellen Versuchen konnten FcγRIIIa-positive T-Zellen in der Kultur mit der Cetuximabresistenten humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 eine Tumorzelllyse durch ADCC bewirken und somit die KRAS-Resistenz im EGFR-Signalweg überwinden. Einhergehend mit einer stärkeren Bindung des IgG1-Antikörpers zeigte sich hier ein deutliche höhere ADCC für 158V-FcγRIIIatragende T-Zellen gegenüber 158F-FcγRIIIa T-Zellen. Wir konnten zeigen, dass die höher affinen 158V-FcγRIIIa-Rezeptoren auch in primären humanen T-Zellen in hohem Maße exprimiert werden können. Dies stellt die Möglichkeit einer therapeutischen Applikation in Aussicht. Die hier etablierten T-Zellen sollten in weiteren Arbeiten eine genauere Untersuchung des ADCC und eine stärkere Lyse von Kolontumorzellen ermöglichen.

Durch FcγRIIIa-T-Zellen in Verbindung mit einer IgG-Antikörpertherapie wäre möglicherweise ein im kolorektalen Karzinom, aber auch bei vielen anderen Tumoren, einsetzbarer Mechanismus gefunden, um Therapieresistenzen zu durchbrechen. Dies könnte neue Möglichkeiten in der Therapie des metastatischen Kolonkarzinoms eröffnen und die Einbeziehung jener Patienten erlauben, die bisher nicht von der Cetuximab-Therapie profitieren konnten.

7 Literaturverzeichnis

Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1147-57.

Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24:603-9.

Ashraf SQ, Nicholls AM, Wilding JL, Ntouroupi TG, Mortensen NJ, Bodmer WF. Direct and immune mediated antibody targeting of ERBB receptors in a colorectal cancer cell-line panel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:21046-51.

Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4:S16-22.

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007; 67:2643-8.

Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frebourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissiere-Michot F. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; 27:1122-9.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer *J Clin Oncol* 2009; 27:663-71.

Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia.

Sci Transl Med 2013; 5:177ra38.

Calemma R, Ottaiano A, Trotta AM, Nasti G, Romano C, Napolitano M, Galati D, Borrelli P, Zanotta S, Cassata A, Castello G, Iaffaioli VR, Scala S. Fc gamma receptor IIIa polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-EGFR antibodies and clinical outcome. *J Transl Med* 2012; 10:232.

Caratelli S, Sconocchia T, Arriga R, Coppola A, Lanzilli G, Lauro D, Venditti A, Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Ferrone S, Sconocchia G. FCgamma Chimeric Receptor-Engineered T Cells: Methodology, Advantages, Limitations, and Clinical Relevance. *Front Immunol* 2017; 8:457.

Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* 2002; 99:754-8.

Caruana I, Diaconu I, Dotti G. From monoclonal antibodies to chimeric antigen receptors for the treatment of human malignancies. *Semin Oncol* 2014; 41:661-6.

Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.

Br J Pharmacol 2009; 157:220-33.

Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2745-52.

Christiansen J, Rajasekaran AK. Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy.

Mol Cancer Ther 2004; 3:1493-501.

Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358:1160-74.

Clemenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, Vie H. Antibodydependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood* 2006; 107:4669-77. Clynes R. Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity.

Hematol Oncol Clin North Am 2006; 20:585-612.

Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.

Nat Med 2000; 6:443-6.

Correale P, Botta C, Cusi MG, Del Vecchio MT, De Santi MM, Gori Savellini G, Bestoso E, Apollinari S, Mannucci S, Marra M, Abbruzzese A, Aquino A, Turriziani M, Bonmassar L, Caraglia M, Tagliaferri P. Cetuximab +/- chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro.

Int J Cancer 2012; 130:1577-89.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.

D'Aloia MM, Caratelli S, Palumbo C, Battella S, Arriga R, Lauro D, Palmieri G, Sconocchia G, Alimandi M. T lymphocytes engineered to express a CD16-chimeric antigen receptor redirect T-cell immune responses against immunoglobulin G-opsonized target cells. *Cytotherapy* 2016; 18:278-90.

D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis* 2018; 9:282.

Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004; 64:4664-9.

de Haas M, Koene HR, Kleijer M, de Vries E, Simsek S, van Tol MJ, Roos D, von dem Borne AE. A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa.

J Immunol 1996; 156:2948-55.

De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:594-603.

De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab.

Ann Oncol 2008; 19:508-15.

de Vries E, Koene HR, Vossen JM, Gratama JW, von dem Borne AE, Waaijer JL, Haraldsson A, de Haas M, van Tol MJ. Identification of an unusual Fc gamma receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood* 1996; 88:3022-7.

Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today* 2007; 12:898-910.

Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy.

Br J Cancer 2007; 96:1166-9.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:5705-12.

Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486:537-40.

Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, Diaz-Rubio E, Santoro A, Van Cutsem E. Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2:ii7-12.

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298:850-4.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-8.

Ellebaek E, Andersen MH, Svane IM, Straten PT. Immunotherapy for metastatic colorectal cancer: present status and new options. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47:315-24.

Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:720-4.

Etienne-Grimaldi MC, Bennouna J, Formento JL, Douillard JY, Francoual M, Hennebelle I, Chatelut E, Francois E, Faroux R, El Hannani C, Jacob JH, Milano G. Multifactorial pharmacogenetic analysis in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based therapy together with cetuximab-irinotecan.

Br J Clin Pharmacol 2012; 73:776-85.

Fakih MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol* 2015; 33:1809-24.

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.

Eur J Cancer 2010; 46:765-81.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.

Int J Cancer 2015; 136:E359-86.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49:1374-403.

Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol* 2010; 28:4390-9.

Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1472-9.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.

Science 2006; 313:1960-4.

Geva R, Vecchione L, Kalogeras KT, Jensen BV, Lenz HJ, Yoshino T, Paez D, Montagut C, Souglakos J, Cappuzzo F, Cervantes A, Frattini M, Fountzilas G, Johansen JS, Hogdall EV, Zhang W, Yang D, Yamazaki K, Nishina T, Papamichael D, Vincenzi B, Macarulla T, Loupakis F, De Schutter J, Spindler KL, Pfeiffer P, Ciardiello F, Piessevaux H, Tejpar S. FCGR polymorphisms and cetuximab efficacy in chemorefractory metastatic colorectal cancer: an international consortium study.

Gut 2015; 64:921-8.

Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; 402:255-62.

Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Bisonni R, Torresi U, Floriani I, Schiavon G, Andreoni F, Maltese P, Rulli E, Humar B, Falcone A, Giustini L, Tonini G, Fontana A, Masi G, Magnani M. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26:1427-34.

Grugan KD, McCabe FL, Kinder M, Greenplate AR, Harman BC, Ekert JE, van Rooijen N, Anderson GM, Nemeth JA, Strohl WR, Jordan RE, Brezski RJ. Tumor-associated macrophages promote invasion while retaining Fc-dependent anti-tumor function. *J Immunol* 2012; 189:5457-66.

Guidoboni M, Gafa R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macri E, Lanza G, Boiocchi M, Dolcetti R. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159:297-304.

Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, Modica M, Cao Y, Manning RJ, Leleu X, Dimmock EA, Kortsaris A, Mitsiades C, Anderson KC, Fox EA, Treon SP. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 2007; 110:2561-4.

Hibbs ML, Tolvanen M, Carpen O. Membrane-proximal Ig-like domain of Fc gamma RIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J Immunol* 1994; 152:4466-74.

Hirvinen M, Heiskanen R, Oksanen M, Pesonen S, Liikanen I, Joensuu T, Kanerva A, Cerullo V, Hemminki A. Fc-gamma receptor polymorphisms as predictive and prognostic factors in patients receiving oncolytic adenovirus treatment. *J Transl Med* 2013; 11:193.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.

N Engl J Med 2010; 363:711-23.

Houot R, Kohrt HE, Marabelle A, Levy R. Targeting immune effector cells to promote antibodyinduced cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 2011; 32:510-6. Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors.

Cancer Res 1990; 50:814s-9s.

Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol* 1996; 103:408-13.

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab.

Cancer Res 2008; 68:1953-61.

Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology.

Immunity 2013; 39:49-60.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:1757-65.

Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997; 90:1109-14.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7.

Kohrt HE, Houot R, Marabelle A, Cho HJ, Osman K, Goldstein M, Levy R, Brody J. Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy* 2012; 4:511-27.

Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 2002; 62:5813-7.

Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, Chng WJ, Campana D. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res* 2014; 74:93-103.

Lanier LL, Cwirla S, Yu G, Testi R, Phillips JH. Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. *Science* 1989; 246:1611-3.

Lanier LL, Kipps TJ, Phillips JH. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med* 1985; 162:2089-106.

Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 1991; 146:1571-6.

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.

Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:4005-10.

Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26:374-9.

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM, Anders RA, Xu H, Yao S, Pons A, Chen L, Pardoll DM, Brahmer JR, Topalian SL. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 2013; 19:462-8.

Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, Monteverde M, Strola G, Lucio F, Tonissi F, Miraglio E, Granetto C, Fortunato M, Merlano MC. Evaluation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity and cetuximab response in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8:222-30. Lopez-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1853-64.

Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA, El-Khoueiry A, Husain H, Wilson PM, Ladner RD, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7884-95.

Magudia K, Lahoz A, Hall A. K-Ras and B-Raf oncogenes inhibit colon epithelial polarity establishment through up-regulation of c-myc. *J Cell Biol* 2012; 198:185-94.

Marechal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Deviere J, Salmon I, Tejpar S, Van Laethem JL. Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2010; 10:340.

Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:309-20.

Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371:1507-17.

Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcberg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol* 2013; 6:1.

Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer.

Nature 2012; 486:532-6.

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F, Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011; 29:610-8.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314:126-9.

Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010; 18:843-51.

Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer.

J Clin Oncol 2008; 26:1789-96.

Nakadate Y, Kodera Y, Kitamura Y, Shirasawa S, Tachibana T, Tamura T, Koizumi F. KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells.

Int J Cancer 2014; 134:2146-55.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:34-47.

Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Barrett J, Ishii E, Yasukawa M. Gene-modified human a/b-T cells expressing a chimeric CD16-CD3z receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:249-62.

Paez D, Pare L, Espinosa I, Salazar J, del Rio E, Barnadas A, Marcuello E, Baiget M. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy?

Cancer Sci 2010; 101:2048-53.

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

Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5944-51.

Pander J, Gelderblom H, Antonini NF, Tol J, van Krieken JH, van der Straaten T, Punt CJ, Guchelaar HJ. Correlation of FCGR3A and EGFR germline polymorphisms with the efficacy of cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46:1829-34.

Park SJ, Hong YS, Lee JL, Ryu MH, Chang HM, Kim KP, Ahn YC, Na YS, Jin DH, Yu CS, Kim JC, Kang YK, Kim TW. Genetic polymorphisms of FcgammaRIIa and FcgammaRIIIa are not predictive of clinical outcomes after cetuximab plus irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer.

Oncology 2012; 82:83-9.

Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, Taieb J. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20:3738-50.

Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. The structure of a human type III Fcgamma receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 2001; 276:16469-77.

Radoja S, Saio M, Schaer D, Koneru M, Vukmanovic S, Frey AB. CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis.

J Immunol 2001; 167:5042-51.

Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions.

J Exp Med 1989; 170:481-97.

Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.

Nat Rev Immunol 2012; 12:269-81.

Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 1993; 177:265-72.

Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy.

J Natl Cancer Inst 1996; 88:100-8.

Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 1994; 343:1177-83.

Rodriguez J, Zarate R, Bandres E, Boni V, Hernandez A, Sola JJ, Honorato B, Bitarte N, Garcia-Foncillas J. Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48:1774-80.

Rosenberg SA. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2012; 4:127ps8.

Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323:570-8.

Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab,

and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study.

J Clin Oncol 2007; 25:4557-61.

Schlaeth M, Berger S, Derer S, Klausz K, Lohse S, Dechant M, Lazar GA, Schneider-Merck T, Peipp M, Valerius T. Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Sci* 2010; 101:1080-8.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.

Schuch G, Kobold S, Bokemeyer C. Evolving role of cetuximab in the treatment of colorectal cancer.

Cancer Manag Res 2009; 1:79-88.

Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, lezzi G, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Horcic M, Tornillo L, Zuber M, Droeser R, Muraro MG, Mengus C, Oertli D, Ferrone S, Terracciano L, Spagnoli GC. Tumor infiltration by FcgammaRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma.

Int J Cancer 2011; 128:2663-72.

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. 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; 276:6591-604.

Shigeta K, Hayashida T, Hoshino Y, Okabayashi K, Endo T, Ishii Y, Hasegawa H, Kitagawa Y. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor Detected by Cetuximab Indicates Its Efficacy to Inhibit and Proliferation of Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* 2013; 8:e66302.

Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64:104-17. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.

Science 2006; 314:268-74.

Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res* 2014; 74:7168-74.

Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 2000; 406:267-73.

Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhireddy D, Martins MM, Gherardini PF, Prestwood TR, Chabon J, Bendall SC, Fong L, Nolan GP, Engleman EG. Systemic immunity Is required for effective cancer immunotherapy. *Cell* 2017; 168:487-502 e15.

Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:580-92.

Tamm A, Schmidt RE. The binding epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. *J Immunol* 1996; 157:1576-81.

Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppa S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5784-9.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443-54.

Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J Clin Oncol 2004; 22:229-37.

Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR, Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, Maloney DG, Fox EA. Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia.

J Clin Oncol 2005; 23:474-81.

Trotta AM, Ottaiano A, Romano C, Nasti G, Nappi A, De Divitiis C, Napolitano M, Zanotta S, Casaretti R, D'Alterio C, Avallone A, Califano D, Iaffaioli RV, Scala S. Prospective evaluation of cetuximab-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) in metastatic colorectal cancer patients predicts treatment efficacy.

Cancer Immunol Res 2016.

Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-17.

Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29:2011-9.

Vance BA, Huizinga TW, Wardwell K, Guyre PM. Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc gamma RIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. *J Immunol* 1993; 151:6429-39.

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:489-99.

Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol* 2017; 10:53.

Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer. immunotherapy Nat Rev Immunol 2010; 10:317-27.

Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:3940-7.

Weng WK, Negrin RS, Lavori P, Horning SJ. Immunoglobulin G Fc receptor FcgammaRIIIa 158 V/F polymorphism correlates with rituximab-induced neutropenia after autologous transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2010; 28:279-84.

Wirthmueller U, Kurosaki T, Murakami MS, Ravetch JV. Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *J Exp Med* 1992; 175:1381-90.

Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease.

J Clin Invest 1997; 100:1059-70.

Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin.

J Clin Invest 1995; 95:1897-905.

Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, Chang HM, Borucka E, Lurje G, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25:3712-8.

8 Abkürzungen

A	
ACT	Adoptiver Zelltransfer
ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
ADCP	Antikörper vermittelte zelluläre Phagozytose
APC	Allophycocyanin
В	
B-ALL	Akute B-Zell-Leukämie
BCG	Bacille Calmette Guérin
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovines Serum-Albumin
С	
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
D	
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	
EDTA	Ethylen Diamin Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F	
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FcγR	Rezeptor für Fc Region von IgG
FITC	Fluorescein-Isocyanat
н	
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsäure
HLA	Human leukocyte antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
1	
la	Immunalobulin
•	

IL	Interleukin
К	
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Μ	
mAbs	Monoclonal Antibodies, monoklonale Antikörper
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
Ρ	
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinase
2	
R	
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	
SEM	Standard error of mean
Т	
ТАА	Tumorassoziierte Antigene
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten

9. Danksagung

9 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie durchführen zu dürfen und die besondere Chance, hierdurch ein Verständnis über die onkologische Immuntherapie und ihr fortwährendes Voranschreiten zu erhalten. Sein Engagement für seine Doktoranden ist außergewöhnlich und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine fachlichen Ratschläge und seine persönliche Förderung und Unterstützung bedanke ich mich sehr.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Sebastian Kobold für seine geduldige und immer zuverlässige Betreuung danken. Sein Ideenreichtum und fachliches Wissen waren Grundlage dieses inspirierenden und spannenden Projektes und ohne ihn wäre der erfolgreiche Abschluss der Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die besondere Gemeinschaft und schöne Zeit in unserem Labor und darüber hinaus. Bei allen meinen Mitdoktoranden aus der Arbeitsgruppe für Immunpharmakologie möchte ich mich für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft in theoretischen und praktischen Fragen bedanken; besonders bei Herrn Simon Grassmann für seinen persönlichen Einsatz für mein Projekt.

Ich danke der Ludwig-Maximilians-Universität und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Aufnahme in ein promotionsbegleitendes Curriculum mit inspirierendem Austausch und Einblicken über vielfältige Forschungsfelder hinweg.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, Rat und Motivation während meines Studiums und dieser Arbeit danken.

Eidesstattliche Versicherung

Berdin, Scarlet Luisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Fcγ-Rezeptor IIIA gentechnisch modifizierte T-Zellen in Kombination mit EGFR-spezifischen Antikörpern zur Lyse von Kolonkarzinomzellen *in vitro*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 10.11.2021

Scarlet Luisa Berdin

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand