

Umlenkung antiviraler Antikörper gegen solide Tumore durch den Einsatz bispezifischer Adapterproteine

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Julia Niemann, M. Sc.

2018

Referent: PD Dr. Florian Kühnel
Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Schwinzer
Tag der Promotion: 17.01.2018

'Research is to see what everybody else has seen and think what nobody else has thought before'

Albert Szent-Györgyi

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung..... 1

Abstract 2

 Schlagworte/Keywords..... 3

2 Einleitung..... 4

 2.1 Tumorimmuntherapie 4

 2.2 Onkolytische Virotherapie..... 5

 2.2.1 Onkolytische Adenoviren 5

 2.2.2 Transkriptionelles und transduktionelles *Targeting* onkolytischer Adenoviren 6

 2.2.3 Immunogenität onkolytischer Adenoviren 8

 2.3 Antikörper-vermittelte anti-tumorale Immunreaktionen..... 10

 2.3.1 Induktion Komplement-abhängiger Zytotoxizität 11

 2.3.2 Induktion Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) 11

 2.3.3 Induktion von CDC und ADCC durch therapeutische Antikörper 12

 2.3.4 Immunstimulation und indirekte Induktion anti-tumoraler Immunantworten durch Immuncheckpointblockade 12

 2.4 Der Rolle einzelner Immunzellpopulationen in Tumorsurveillance, Tumorprogression und Tumorthherapie 14

 2.5 Polysialinsäure als Tumor-assoziiertes Antigen 17

 2.6 Zielsetzung der Arbeit 18

3 Ergebnisse..... 19

 3.1 *In vitro* Untersuchung des Adapterproteins DE1scFvpSia zum molekularen *Retargeting* anti-adenoviraler Antikörper gegen solide Tumore 19

 3.1.1 Quantifizierung der Bindung anti-adenoviraler Antikörper an die DE1-Domäne des Adenovirus-Hexon bzw. das Adapterprotein DE1scFvpSia 19

 3.2 Untersuchungen zum therapeutischen Potenzial eines Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings* 24

 3.2.1 Ermittlung des optimalen Applikationswegs des Adapters..... 26

 3.2.2 Therapeutische Wirksamkeit in weiteren subkutanen Tumormodellen 28

 3.2.3 Therapeutische Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* in größerem Abstand zur Immunisierung..... 30

 3.2.4 Antikörper-*Retargeting* im orthotopen Tumormodell der Leber 31

 3.2.5 Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Antikörper-*Retargeting*-Strategie auf die alternative Zielstruktur humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA)..... 32

3.3	Untersuchungen zu den zugrundeliegenden Wirkmechanismen der Adaptertherapie	34
3.3.1	Charakterisierung der tumorinfiltrierenden Immunzellen in Folge der Adaptertherapie ..	34
3.3.2	Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten nach Adaptertherapie	42
3.3.3	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Immunzelltypen <i>in vivo</i>	43
3.3.4	Bestätigung der tumorinfiltrierenden Zellen nach Adaptertherapie im CMTpSia-Tumormodell	46
3.4	Therapeutische Wirksamkeit im metastasierenden Modell	48
3.5	Untersuchungen zur Sequenztherapie von onkolytischer Virotherapie und Antikörper- <i>Retargeting</i>	50
3.5.1	Charakterisierung der tumorinfiltrierende Immunzellen in Folge der Sequenztherapie aus Viro-und Adaptertherapie	51
3.5.2	Induktion von Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantworten durch die Sequenztherapie	59
3.6	Untersuchungen zum Antikörper- <i>Retargeting</i> als Initiationstherapie für Immuncheckpoint-Blockade	60
3.6.1	Induktion von Tumor-spezifischen CD8 T-Zellantworten durch Adapter-unterstützte PD-1 Immuncheckpointblockade	62
3.6.2	Therapeutische Effizienz einer Immuncheckpointblockade während der etablierten Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem Antikörper- <i>Retargeting</i>	64
4	Diskussion	67
4.1	Die Auswahl eines geeigneten Antikörper-bindenden Liganden für ein bispezifisches Adapterprotein	68
4.2	Auswahl geeigneter Tumor-spezifischer Liganden für ein bispezifisches Adapterprotein	69
4.3	Untersuchungen zum therapeutischen Potential des Adapter-vermittelten Antikörper <i>Retargetings in vivo</i>	71
4.3.1	Allgemeine Einsetzbarkeit des Antikörper- <i>Retargetings</i> auf eine alternative Zielstruktur	73
4.3.2	Therapeutische Wirksamkeit im autochthonen Tumormodell der Leber	73
4.4	Untersuchungen zu den immunologischen Wirkmechanismen der Adaptertherapie	74
4.4.1	Einfluss der Adaptertherapie auf das Tumormikromilieu	74
4.4.2	Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten in Folge des Antikörper- <i>Retargetings</i>	77
4.4.3	Untersuchungen zur Rolle von Makrophagen, NK-Zellen und CD8 T-Zellen an der therapeutischen Wirkung des Antikörper- <i>Retargetings</i>	77
4.5	Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit auf Metastasen	78
4.6	Therapeutische Konzepte zur gezielter Kombination des Adapter-vermittelten Antikörper- <i>Retargetings</i> mit weiteren Tumorimmuntherapien	79

4.6.1	Untersuchungen zur therapeutischen Effizienz einer Sequenztherapie aus initialer Virotherapie gefolgt von Antikörper- <i>Retargeting</i>	79
4.6.2	Antikörper- <i>Retargeting</i> als Basis für eine effiziente Immuncheckpointblockade	82
4.6.3	Virotherapie-Antikörper- <i>Retargeting</i> -Sequenz als Basis für PD-1 Immuncheckpointblockade	83
4.7	Ausblick.....	85
5	Material und Methoden	86
5.1	Geräte.....	86
5.2	Materialien	87
5.2.1	Antikörper.....	87
5.2.2	Peptide	88
5.2.3	Chemikalien und Enzyme	88
5.2.4	Verwendete Materialien	90
5.2.5	Medien	91
5.2.6	Kits	91
5.2.7	Puffer und Lösungen	91
5.2.8	Eukaryotische Zelllinien.....	93
5.2.9	Bakterienstämme	95
5.2.10	Plasmide	95
5.2.11	Oligonukleotide	98
5.3	Klonierung	98
5.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	98
5.3.2	Gelelektrophorese	99
5.3.3	DNA-Aufreinigung.....	99
5.3.4	Restriktionsverdau.....	100
5.3.5	Klenow <i>fill-in</i>	100
5.3.6	Dephosphorilierung.....	100
5.3.7	Ligation	100
5.3.8	Transformation.....	101
5.3.9	Analytische DNA-Präparation.....	101
5.3.10	Kontrollverdau und Sequenzierung.....	101
5.3.11	Quantitative DNA-Präparation	102
5.3.12	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	102
5.4	Virologie	102

5.4.1	Retrovirale Transduktion	102
5.4.2	Adenoviren	103
5.4.3	Präparation von Adenoviren	103
5.4.4	Titrierung von Adenoviren	105
5.5	Zellkultur.....	106
5.5.1	Kultivierung	106
5.5.2	Zellpassage	107
5.5.3	Bestimmung der Zellzahl	107
5.5.4	Einfrieren von Zellen	107
5.5.5	Aufbereitung von Zellen zur Injektion in die Maus	107
5.5.6	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI).....	108
5.5.7	Stabile Transfektion mit PEI und Sleeping Beauty Transposase	108
5.5.8	Etablierung von Primärzellkulturen.....	108
5.5.9	Komplement-Aktivierungs-Assay	109
5.5.10	Luciferasemessung	109
5.6	Proteinbiochemische Methoden.....	109
5.6.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine	109
5.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	110
5.6.3	ELISA	110
5.6.4	SDS-Page.....	111
5.6.5	Western Blot.....	111
5.7	Tierexperimentelle Methoden	112
5.7.1	Mausstämme	112
5.7.2	Immunisierung gegen Adenovirus.....	113
5.7.3	Etablierung von Lungenmetastasen.....	113
5.7.4	Etablierung und Volumenbestimmung subkutaner Tumore.....	113
5.7.5	Intratumorale Virotherapie	113
5.7.6	Adaptertherapie	113
5.7.7	Immuncheckpointblockade	113
5.7.8	<i>In vivo</i> Depletion von Immunzellen.....	113
5.7.9	Blutentnahme.....	114
5.7.10	Induktion von Lebertumoren mittels <i>in situ</i> Elektroporation	114
5.7.11	Abbruchkriterien	115

5.7.12	Entnahme und Aufbereitung von Gewebeproben	115
5.8	Immunologische Methoden	116
5.8.1	Antigen-Stimulation von Splenozyten	116
5.8.2	Färbung von Zellen mit Fluoreszenzantikörpern für die Analyse im FACS.....	117
5.8.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	118
5.9	Histologie.....	119
5.9.1	Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung.....	119
5.9.2	Hämalaun-Eosin(H/E)-Färbung.....	119
5.9.3	Immunhistochemische Färbung von CD45.....	119
5.10	Statistische Analysen und verwendete Programme	120
5.10.1	Verwendete Programme	120
5.10.2	Statistische Analysen	120
6	Literaturverzeichnis	121
7	Anhang.....	141
7.1	Abkürzungsverzeichnis	141
7.2	Abbildungsverzeichnis	144
7.3	Tabellenverzeichnis	146
8	Publikationen und Konferenzbeiträge	147
9	Lebenslauf	148
10	Danksagung	149

1 Zusammenfassung

Die Tumormimmuntherapie mit onkolytischen Viren stellt eine innovative und vielversprechende Behandlungsmethode dar. Onkolytische Viren induzieren jedoch starke humorale Immunantworten gegen das eingesetzte Virus, die die Therapiewirkung beeinträchtigen. Im Rahmen der Dissertation wurde untersucht, ob sich humorale Immunantworten gegen das häufig als onkolytischen Vektor eingesetzte humane Adenovirus Serotyp 5 durch molekulares ‚Retargeting‘ für eine gezielte Tumorthherapie umlenken lassen. Ein *Retargeting* anti-viraler Antikörper gegen Tumorzellen wurde durch den Einsatz eines bispezifischen Adapterproteins, bestehend aus der Antikörper-bindenden Domäne DE1 des adenoviralen Kapsidproteins Hexon und einem Tumor-spezifischen Liganden realisiert. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich mit Hilfe der Hexon DE1-Domäne ein substantieller Teil anti-adenoviraler IgGs binden und für ein molekulares *Retargeting* im Kontext eines bispezifischen Adapters nutzen lässt. Die therapeutische Aktivität des Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings* konnte in verschiedenen subkutanen Tumormodellen in immunkompetenten Mäusen mit Polysialinsäure als exemplarisches Tumor-spezifisches Ziel bestätigt werden. Antikörper-*Retargeting* nach systemischer Gabe des Adapters resultierte in einer spezifischen Tumorstimmungs-inhibition und einem signifikant verlängerten Überleben von Adenovirus-immunisierten Mäusen. Untersuchungen mit orthotopen Lebertumoren bestätigten zudem die therapeutische Wirksamkeit in einem klinisch relevanten Mausmodell. Mit humanem Karzinoembryonalem Antigen als alternativem Ziel des *Retargetings* konnte eine Übertragbarkeit der Therapiestrategie auf weitere Zielstrukturen und damit die Belastbarkeit des Konzepts bestätigt werden. Mechanistisch wurden NK-Zellen und CD8 T-Zellen als wesentliche Mediatoren der therapeutischen Wirkung identifiziert. Hierbei übernehmen NK-Zellen eine zentrale Rolle bei der systemischen Triggerung von Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellen. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Antikörper-*Retargeting* die therapeutische Wirkung einer onkolytischen Virotherapie effektiv amplifiziert und maßgeblich die lokale Immunzellinfiltration in das Tumorgewebe sowie die Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen fördert. Darüber hinaus bildet ein Antikörper-*Retargeting* eine Basis für eine effektive PD-1-Immuncheckpointblockade und ermöglicht die Überwindung bestehender Resistenzen gegen diese Form der Immuntherapie. Letztendlich konnte durch ein integriertes Therapieschema, bestehend aus Virotherapie mit nachfolgendem Antikörper-*Retargeting* und PD-1 Blockade ein tumorfreies Langzeitüberleben in einem Großteil der therapierten Mäuse erzielt werden. Diese Daten zeigen, dass sich durch den Einsatz bispezifischer Adapterproteine anti-adenovirale Antikörper erfolgreich gegen Tumorzellen lenken lassen und dieses *Retargeting*, nicht nur als Monotherapie sondern auch in Kombination mit anderen Immuntherapien, eine hochwirksame und innovative Strategie für die Therapie solider Tumore darstellt.

Abstract

Oncolytic viruses are promising tools for the immunotherapy of solid tumors. They yet induce strong humoral immune responses directed against the viral vector, thus limiting viral spread and therapeutic efficacy. The aim of this study was to investigate whether humoral immune responses raised by the human adenovirus serotype 5, a common vector with high immunogenicity, can be used for cancer therapy by molecular retargeting to malignant cells. Effective retargeting of anti-adenoviral antibodies was achieved using bispecific adapter molecules, consisting of the adenovirus hexon DE1 domain and a tumor-specific ligand. *In vitro* studies confirmed the DE1 domain as a major target of anti-adenoviral IgGs and as a suitable antibody-binding domain fused to a tumor-ligand to generate a bispecific adapter. The therapeutic efficacy of adapter-based antibody retargeting was verified using different immunocompetent murine subcutaneous tumor models with polysialic acid as a tumor-specific target. After systemic administration of the adapter, antibody-retargeting led to tumor growth inhibition and significantly prolonged survival of adenovirus-immunized mice. Moreover, investigations in a polysialic acid-expressing orthotopic liver tumor model showed that therapeutic efficacy can be translated into a clinically relevant mouse model. To show the transferability of this therapeutic strategy to alternative target structures we successfully demonstrated the antibody retargeting capacity of a corresponding adapter protein with carcinoembryonic antigen as a tumor-specific target. To unravel mechanistic aspects of antibody retargeting, depletion experiments were carried out. The results demonstrated that NK cells and CD8 T cells are the main mediators of therapeutic activity *in vivo*. More specifically, it could be shown that NK cells play a critical role in triggering systemic anti-tumor CD8 T cell responses during adapter treatment. In addition, antibody-retargeting following oncolytic virotherapy is an effective strategy which amplifies lymphocyte tumor infiltration, stimulates tumor antigen specific CD8 T cells and benefits overall therapeutic efficacy. Furthermore, antibody retargeting proved to be a suitable approach to prime tumors for immune checkpoint inhibition of PD-1 and to overcome resistance against this kind of immunotherapy. Finally, integration of PD-1 blockade into an adapter-supported virotherapy resulted in tumor-free long-term survival in the vast majority of treated mice. These results show that bispecific adapters are feasible tools for successful tumor-directed retargeting of viral antibodies and represent an innovative new therapeutic strategy. Even more, antibody retargeting may also be a promising integrative element of multimodal immunotherapies for the treatment of solid cancers.

Schlagworte:

- Tumorimmuntherapie
- Antikörperretargeting
- Virotherapie

Keywords:

- Cancer immunotherapy
- Antibody Retargeting
- Virotherapy

2 Einleitung

2.1 Tumorimmuntherapie

Die Immuntherapie von Tumoren reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Als einer der Pioniere und Mitbegründer der Immuntherapie gilt Dr. William B. Coley. Ende der 1880er Jahre berichtete er von Patienten mit verschiedenen inoperablen Sarkomen, die eine Reduktion der Tumormasse in Folge einer Streptokokkeninfektion („Erysipel“ durch *Streptococcus erysipelatis*) aufwiesen. Dies konnte durch natürliche Infektion oder intratumoraler Inokulation von Bakterienkulturen erreicht werden (Coley, 1891, 1893). In den folgenden Jahren begann Coley nicht infektiöse, Toxin-haltige Extrakte aus bakteriellen Kokulturen von *Streptococcus erysipelatis* und *Bacillus prodigiosus* für die Tumorthherapie einzusetzen. Der Einsatz dieser heute als Coley's Toxine bekannten Extrakte resultierte in teilweise vollständigen Tumorremissionen, auch in Patienten mit fortgeschrittenen metastasierten Tumoren (Coley, 1910). In Folge dieser Ergebnisse postulierte Coley, dass die systemische Aktivierung des Immunsystems für die Tumorremission verantwortlich ist (Coley, 1910). Innerhalb des letzten Jahrhunderts wurden auf dieser Pionierarbeit aufbauend verschiedene Immuntherapien zur Aktivierung des Immunsystems gegen Tumore entwickelt. Dazu gehören unter anderem Behandlungen mit verschiedenen immunmodulierenden Molekülen wie Interferonen (IFN) (Wiesenfeld et al., 1995; Windbichler et al., 2000), Interleukinen (ILs) (Rosenberg et al., 1998; Sosman et al., 1994) oder Tumornekrosefaktor (TNF) (Lenk et al., 1989; Skillings et al., 1992). Von diesen Molekülen weiß man heutzutage, dass sie auch in Folge der Applikation bakterieller Toxine ausgeschüttet werden und zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems führen (Dranoff 2004). Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden immer effizientere und gezieltere Strategien zur Tumorimmuntherapie entwickelt. Ein solcher Ansatz stellt unter anderem die Behandlung mittels onkolytischer Viren dar. Sie ermöglichen eine effiziente Zerstörung von Tumorzellen durch eine tumorselektive Infektion bzw. Replikation und unterstützen die Induktion anti-tumoraler Immunantworten (Li et al., 2009; Nemunaitis et al., 2000; Tuve et al., 2009). Ein weiteres Beispiel mit hohem anti-tumoralem Potenzial bilden therapeutische monoklonale Antikörper. Hierzu gehören therapeutische Antikörper, die in der Lage sind, durch eine hochspezifische Erkennung Tumor-assoziiertes Strukturen und anschließende Aktivierung von Immunmechanismen die gezielte Zerstörung von Tumorzellen zu induzieren (Hsu et al., 2010; Pahl et al., 2012). Darüber hinaus konnte ein wesentlicher Fortschritt durch die Entwicklung einer neuen Klasse an Antikörpern gemacht werden. Diese sind in der Lage, durch die Inhibition von Immuncheckpoints innerhalb der T-Zellaktivierung eine Überwindung der Tumor-induzierten Immunsuppression zu erzielen (Pardoll, 2012; Schläpfer et al., 2014).

2.2 Onkolytische Virotherapie

Onkolytische Viren zeichnen sich durch eine tumorselektive Infektion bzw. Replikation aus, die zu einer Zerstörung von Tumorzellen führt, während gesundes Gewebe überwiegend nicht geschädigt wird. Eine Reihe an Virustypen weist bereits neben ihrem natürlichen Tropismus eine deutliche Präferenz für Tumorzellen auf (Coffey et al., 1998; Stojdl et al., 2000). Entsprechende Fälle in denen Krebspatienten im Verlauf einer Virusinfektion eine Tumorremission zeigten, wurden bereits Anfang des letzten Jahrhunderts beschrieben (Dock, 1904; Moore and O'Connor, 1950; Taylor, 1953). Die Regressionen hielten dabei teilweise über Wochen und Monate an, bevor erneutes Tumorwachstum eintrat (Mota, 1973; Taqi et al., 1981). Im Falle eines Jungen mit Burkitt's Lymphom führte die Infektion mit Masern sogar zu einer vollständigen Tumorremission (Bluming und Ziegler 1971). Diese ersten Studien zeigten das immense Potenzial einer viralen Tumorthherapie auf und begründeten erste therapeutischen Versuche mit natürlich onkolytischen Viren (Asada, 1974; Smith et al., 1956; Taylor, 1953). Im Verlauf der letzten Jahrzehnte rückte die Entwicklung rekombinanter onkolytischer Viren zunehmend in den Vordergrund. Diese bieten wesentliche Vorteile gegenüber natürlichen Viren, insbesondere im Hinblick auf die sichere Anwendbarkeit. Durch gezielte genetische Manipulation kann hierbei die Tumorselektivität deutlich verbessert und die unerwünschte Transmission verhindert werden (Russell and Peng, 2007). Studien mit unterschiedlichen rekombinanten onkolytischen Viren, darunter Herpes simplex Virus (HSV), Masern Virus (MV), Vaccinia Virus (VV) und Adenovirus (Ad), konnten inzwischen die klinische Effizienz und sichere Anwendung dieser Viren bestätigen (Brief, 2016; Galanis et al., 2010; Nemunaitis et al., 2001; Park et al., 2008; Senzer et al., 2009). 2015 erfolgte die erste klinische Zulassung eines onkolytischen Virus zur Krebstherapie in den USA und Europa in Form des onkolytische Herpes-Virus Talimogene laherparepvec (T-Vec) zur Behandlung des inoperablen metastasierten Melanoms. Die Phase III Studie konnte zeigen, dass lokale intratumorale Injektion von T-Vec zu einer systemischen Triggerung anti-tumoraler Immunantworten führen kann und das Gesamtüberleben signifikant anhebt (Andtbacka et al., 2015).

2.2.1 Onkolytische Adenoviren

Die Verwendung von Adenoviren als onkolytische Vektoren bietet einige wesentliche Vorteile. Durch intensive Forschung innerhalb der letzten Jahrzehnte sind die Mechanismen zur Replikations- und Zellzykluskontrolle sehr gut verstanden und das adenovirale Genom ermöglicht eine vergleichsweise einfache genetische Manipulation. Darüber hinaus verfügen Adenoviren über einen lytischen Replikationszyklus, sie lassen sich vergleichsweise schnell in hohen Titern herstellen, sind in der Lage, teilende sowie ruhende Zellen zu infizieren und integrieren in der Regel nicht in das Genom der infizierten Zellen (Rein et al., 2006).

Allgemein gehören humane Adenoviren (Ad) zur Familie der Adenoviridae und können beim Menschen verschiedene Erkrankungen, vorwiegend Atemwegsinfekte, hervorrufen. Adenoviren verfügen über ein doppelsträngiges lineares DNA-Genom und ein ikosaedrisches Kapsid. Das Kapsid besteht vorwiegend aus den drei Hüllproteinen Fiber, Penton und Hexon. Das Hexon stellt mit einem Anteil von über 80 % das Hauptprotein des Viruskapsids dar und hat vorwiegend eine strukturgebende Funktion. *In vivo* scheint es jedoch auch maßgeblich an der Infektion von Hepatozyten über die Bindung des Serum Faktors X beteiligt zu sein und somit zum Leber-Tropismus von Adenoviren beizutragen (Kalyuzhniy et al., 2008; Waddington et al., 2008). Wie aus *in vitro* Studien hervorgeht, erfolgt der klassische Weg der Zellinfektion jedoch über das Fiber- und Pentonprotein. Die Fiber Knob Domäne vermittelt hierbei den Kontakt zur Zielzelle, indem sie an den entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet (Shayakhmetov et al., 2003). Dieser Rezeptor variiert zwischen den einzelnen Ad-Serotypen, bei den am häufigsten genutzten Vektoren, darunter Ad2 und Ad5, erfolgt die Interaktion jedoch mit dem Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997). Nach dem Fiber-vermittelten Zellkontakt, erfolgt durch die Interaktion der Penton-Basis mit zellulären Integrinen die Internalisierung des Viruspartikels über Endozytose (Wickham et al., 1993). Im Anschluss erfolgen die Freisetzung der viralen DNA, Transport in den Nukleus und die Transkription der Virusgene. In der Transkriptionshierarchie unterscheidet man zwischen den frühen Genen (*early genes*), die essentiell für die virale Replikation, die Regulierung zellulärer Prozesse und die Modulierung der Immunreaktion sind, und den späten Genen (*late genes*). Diese sind für die strukturgebenden viralen Proteine und die Verpackung der Virus-DNA in virale Partikel verantwortlich (Shenk, 1996). Die virale Replikation führt letztendlich zur Lyse der Zelle und Freisetzung der viralen Partikel. Durch gezielte Modifikationen, die den natürlichen Mechanismus des Zelleintritts von Adenoviren oder die anschließende Transkription und Replikation der viralen DNA an Tumor-spezifische Merkmale knüpfen, lässt sich eine hohe Tumorselektivität dieser Viren erzielen.

2.2.2 Transkriptionelles und transduktionelles *Targeting* onkolytischer Adenoviren

In vivo weisen die meisten Adenoviren eine geringe Affinität zu Tumoren auf. Eine systemische Applikation resultiert hingegen in einer starken Transduktion des Lebergewebes durch Aufnahme der viralen Partikel in Kupfferzellen und Hepatozyten, resultierend in einer akuten Lebertoxizität nach systemischer Applikation (Lieber et al., 1997; Muruve et al., 1999). Um für die onkolytische Virotherapie eine bessere bzw. gezielte Infektion und Lyse maligner Zellen zu erreichen, wurden innerhalb der letzten Jahrzehnte verschiedene Strategien zum *Retargeting* von Adenoviren verfolgt. Ein Ansatz basiert hierbei auf dem transkriptionellen *Targeting* zur konditionalen Replikation des Virus. Konditional-replikationskompetente Adenoviren (CrAds) zeichnen sich durch eine sehr hohe Tumorselektivität aus. Diese kann beispielsweise durch die Deletion von Pathogenitätsfaktoren erreicht werden, die zur

Modellierung der Virus-gerichteten Immunantwort und Regulation zellulärer Prozesse dienen. Eines der ersten entwickelten Beispiele hierfür ist das CrAd ONYX-015, welches eine Deletion im E1B55k Gen aufweist (Heise et al., 1997). E1B55k ist ein essentielles virales Gen. Es hat die Funktion, p53 in der Zielzelle zu inaktivieren und somit zu verhindern, dass die aktive Apoptose der Zelle eingeleitet wird. Der Verlust des Gens verhindert somit eine effiziente Virusreplikation und anschließende Verbreitung viraler Partikel in gesunden Zellen, während die in malignen Zellen häufige Dysfunktion von p53 eine Replikation des Virus gestattet (Bischoff et al. 1996; Harada et al. 2005). Die Tumorselektivität und sichere Anwendbarkeit von ONYX-015 konnte in klinischen Studien belegt werden (Au et al., 2007; Nemunaitis et al., 2000). Die therapeutische Effizienz konnte die hohen Erwartungen jedoch nur eingeschränkt erfüllen (Makower et al., 2003; Mulvihill et al., 2001; Nemunaitis et al., 2001). Ein weiteres Beispiel, in dem eine häufige Dysfunktion zellulärer Signalwege in malignen Zellen für das *Targeting* von Viren genutzt wurde, repräsentieren onkolytische Adenoviren mit Deletionen im E1A-Gen (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). E1A interagiert mit dem Retinoblastom-Protein (pRB) der Zelle, das den Übergang zwischen der G1 und der S-Phase während des Zellzyklus reguliert. Die Bindung von E1A an pRB fördert den Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase (Bandara and La Thangue, 1991). Der Eintritt der Zelle in die S-Phase ermöglicht im Anschluss die Replikation der viralen DNA. Durch eine Deletion in der pRB Bindungsstelle des E1A-Gens, kann die Virusreplikation in gesunden ruhenden Zellen deutlich reduziert werden. Im Gegensatz dazu ist das Virus in der Lage, effizient in verschiedenen Tumorzellen mit Defekten im G1 zu S Zellzykluscheckpoint zu replizieren (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). Eine andere intensiv verfolgte Strategie zur Einschränkung der Virusreplikation in gesunden Zellen ist die Kontrolle replikationsessentieller Gene unter Tumor-spezifischen Promotoren. Zu diesen Tumor-selektiven Promotoren gehören unter anderen Promotoren für das Alpha-Fetoprotein (AFP), das prostataspezifische Antigen (PSA), den humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTert) Promotor und den Transkriptionsfaktor E2F. Ein Beispiel ist AvE1a04i, ein CrAd dessen E1A-Expression unter der Kontrolle des AFP Promotors liegt (Hallenbeck et al., 1999). Eine hohe AFP Expression tritt häufig beim Leberzellkarzinom (HCC) auf. Es konnte in diesem Zusammenhang bestätigt werden, dass AvE1a04i gut in AFP-positiven humanen HCC-Zelllinien repliziert, während dessen die Replikation in gesunden AFP-negativen Zellen deutlich vermindert ist (Hallenbeck et al., 1999). Verschiedene CrAds wurden zudem durch die Kontrolle Replikations-essentieller Gene unter dem hTert Promotor entwickelt. Eine Aktivierung dieses Promotors liegt in der Mehrheit aller Tumorzellen vor, während er in gesunden somatischen Zellen inaktiv ist. Dies resultiert in einer guten Tumorselektivität dieser Viren (Kim et al., 2003; Wirth et al., 2003). Erste klinische Studien mit Telomerase-abhängigen onkolytischen Adenoviren konnten die Tumor-Selektivität und sichere Applikation bestätigen (Hemminki et al., 2012; Nemunaitis et al., 2010).

Im Zusammenhang mit einer gezielten lokalen (intratumoralen) Applikation stellen CrAds sehr wirksame anti-tumorale Agenzien mit ausgezeichnetem Sicherheitsprofil dar. Ein angestrebter Applikationsweg zur Behandlung schwer zugänglicher Tumore oder fortgeschrittener disseminierter Erkrankungen stellt jedoch die intravenöse Therapieform dar. Bei einer solchen systemischen Behandlung führt ein rein transkriptionelles *Targeting* zwar zu einer verminderten Lebertoxizität (Au et al., 2007), jedoch wird ein Großteil der Viren im Lebergewebe absorbiert und gelangt nicht zum Tumor. Um die initiale Tumorzellinfektion zu verbessern, wurden verschiedene Strategien zum transduktionellen *Targeting* durch Modifikationen des Viruskapsids entwickelt. Eine besteht in der Pseudotypisierung des Rezeptorbindenden Fiber bzw. Fiber-Knob Proteins. Hierbei erfolgt der Austausch gegen Fiber-Proteine anderer Serotypen mit CAR-unabhängigem Infektionsweg oder die Bildung chimärer Fiber-Proteine mit verminderter CAR-Affinität. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Konstruktion eines chimären Fiber-Proteins, durch den Austausch der Fiber-Knob Domäne des Ad5 durch die Knob Domäne des CAR-unabhängigen infizierenden Ad3, der CAR-vermittelte Zelleintritt deutlich reduziert werden kann (Krasnykh et al., 1996). Ein weiterer Ansatz zur gezielten Infektion von malignen Zellen bzw. zum *Detargeting* der Leber besteht in der Nutzung von Adaptermolekülen. Diese führen durch die gleichzeitige Bindung der Fiber-Knob-Domäne des Virus und einer Tumor-spezifischen Zellstruktur zu einem modifizierten Zelleintritt. Beispiele hierfür sind bi-spezifische Adaptermoleküle mit einer anti-Knob Bindedomäne und einer Domäne spezifisch für einen Tumor-selektiven Rezeptor. Ein entsprechendes Molekül, bestehend aus einem anti-Knob Antikörperfragment und dem Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF2, führte zu einer selektiven Infektion von FGF2-positiven Tumorzellen *in vitro* und einer verringerten Lebertoxizität *in vivo* (Goldman et al., 1997; Gu et al., 1999). In anderen *Retargeting*ansätzen mit bispezifischen Molekülen wurde anstatt eines Knob-bindenden Antikörperfragments eine lösliche Variante der CAR-Ektodomäne (des natürlichen Ad-Rezeptors CAR) verwendet (Dmitriev et al., 2000). Durch Fusion der Domäne an eine Tumor-spezifische Zielstruktur konnte *in vitro* und *in vivo* ein spezifisches *Targeting* von Tumorzellen und ein gleichzeitiges *Detargeting* der Leber nach intravenöser Virusapplikation erzielt werden (Kloos et al., 2015; Li et al., 2009).

2.2.3 Immunogenität onkolytischer Adenoviren

Adenoviren sowie die meisten anderen onkolytischen Viren zeichnen sich durch eine sehr hohe Immunogenität aus. Diese Eigenschaft birgt einige Nachteile, da sowohl starke zelluläre als auch humorale Immunantworten gegen den viralen Vektor induziert werden. Diese Induktion führt zu einer schnellen Eindämmung der Virusinfektion und steht somit einer effizienten Verbreitung des Virus und vollständigen Tumorzelllyse entgegen. Durch eine sehr schnelle Neutralisierung der Partikel durch anti-virale (neutralisierende) Antikörper reduzieren diese Immunantworten in hohem Maße die Effektivität

einer wiederholten Applikation des gleichen Vektors (Yang et al., 1995). In diesem Zusammenhang stellt auch die hohe Seroprävalenz gegen gängige Vektoren des Serotyps 2 und 5 eine entscheidende Hürde dar, da viele Patienten bereits durch früheren Kontakt mit den Wildtyp-Viren immunisiert sind (Chirmule et al., 1999; Schmitz et al., 1983). Ein wesentliches Ziel insbesondere der humoralen Immunantwort gegen Adenovirus stellt das Haupthüllprotein Hexon dar (Sumida et al., 2005). Dieses kann von anti-viralen IgM sowie allen 4 Subklassen an IgGs erkannt werden (Gahéry-Ségard et al., 1997). Das Ad5-Hexonmonomer beinhaltet verschiedene Struktur motive, die Basis des Moleküls ist hoch konserviert zwischen den einzelnen Adenovirusserotypen und zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus (Rux et al., 2003). Der exponierte Teil des Moleküls, der die Virusoberfläche bildet, hingegen besteht aus flexiblen, kaum konservierten Regionen mit hoher Diversität zwischen den Serotypen. Hier finden sich die drei *Loop*-Domänen DE1, FG1 und FG2, die insgesamt über 9 hypervariable Regionen (HVRs) mit Serotyp-spezifischen Aminosäureresten verfügen (Crawford-Mikszsa und Schnurr 1996; Rux et al. 2003). Aufgrund ihrer Lokalisation an der Virusoberfläche und der hohen Individualität werden insbesondere diese Regionen mit der serotypischen Immunreaktion assoziiert. Studien belegen, dass durch den Austausch der HVRs der Einfluss vorherrschender Immunantworten und die Erkennung durch neutralisierende Antikörper deutlich gemindert werden kann (Bruder et al., 2012; Roberts et al., 2006). Abgesehen von der humoralen Antwort konnte gezeigt werden, dass die konservierten Strukturen des Hexons sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellepitope enthalten und somit Ziel zellulärer Immunantworten sind (McKelvey et al., 2004; Onion et al., 2007).

Die Immunogenität von onkolytischen Viren ist ein kontrovers diskutiertes Thema (Prestwich et al., 2009). Offensichtlich steht sie einer effektiven und vor allem vollständigen Infektion und Zerstörung des Tumors durch den Virus entgegen. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass eine hohe Immunogenität der viralen Vektoren maßgeblich zur Induktion anti-tumoraler Immunantworten beiträgt (Li et al., 2017; Tuve et al., 2009). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein entscheidender therapeutischer Aspekt neben der direkten Infektion und Lyse von Tumorzellen, die starke Aktivierung des Immunsystems ist. Diese führt neben der Induktion anti-viraler Immunantworten gleichzeitig zur Entstehung einer langanhaltenden Anti-Tumor-Immunität (Kanerva et al., 2013; Tuve et al., 2009). Eindeutige Belege hierfür lieferten Versuche in immundefizienten Mausmodellen, in denen onkolytische Virotherapie eine wesentlich geringere Effizienz zeigten, als in immunkompetenten Mäusen. Die verminderte Wirksamkeit der Therapie korrelierte dabei mit einer deutlichen Reduktion an Immunzellinfiltraten in dem behandelten Tumorgewebe (Endo et al., 2002; Toda et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche mit immunsuppressiven Mitteln, die zwar die Virusreplikation förderten, jedoch insgesamt die Zerstörung maligner Zellen und die Aktivität Tumor-gerichteter zytotoxischer T-Lymphozyten reduzierten (Breitbach et al., 2007; Todo et al., 1999). Mittlerweile ist bekannt, dass die

starke Immunreaktion auf die virale Infektion zu einer Infiltration verschiedener Immunzellen in das sonst immunsuppressive Tumorgewebe führt und diese Infiltration maßgeblich an der Induktion einer anti-tumoralen Antwort beteiligt ist. So bewirkt die lokale Entzündungsreaktion in Folge der onkolytischen Virotherapie u.a. eine Triggerung Tumor-spezifischer Immunzellen (Boozari et al., 2010; Woller et al., 2011). Die Infiltration von dendritischen Zellen in das Tumorgewebe ermöglicht hierbei die effektive Kreuzpräsentation von Tumor-Antigenen, wodurch eine Induktion von sowohl Virus-gerichteten als auch Tumor-spezifischen T-Zellantworten erfolgt (Ramakrishna et al., 2009; Tuve et al., 2009; Woller et al., 2011).

Um die therapeutische Effizienz onkolytischer Viren weiter zu verbessern, erfolgte die Entwicklung einer neuen Generation onkolytischer Viren. Diese sollten durch eine zusätzliche Expression immunmodulierender Molekül, die Virus-vermittelte Induktion Tumor-gerichteter Immunantworten verstärken. Ein Beispiel stellt das Ad5/3-D24-GMCSF dar, ein onkolytisches Adenovirus 5 mit Serotyp 3/5-chimärem Kapsid codierend für den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GMCSF). Ad5/3-D24-GMCSF zeigte in vorklinischen Studien in Patienten mit soliden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium eine sehr gute therapeutische Wirkung und war in der Lage, anti-tumorale CD8 T-Zellantworten zu induzieren (Koski et al., 2010). Weitere Beispiele bilden onkolytische Adenoviren codierend für CD40L, Mip1 α (*macrophage-inflammatory protein alpha*), Flt3L (*FMS-like tyrosine kinase-3 ligand*) oder verschiedene Interferone (Benedict et al., 2004; Diaconu et al., 2012; Ramakrishna et al., 2009). Die Expression von CD40L sowie MIP1 α und FLT3L führten hierbei zu einer Rekrutierung Antigen-präsentierender Zellen in das Tumorgewebe und zu einer Induktion von CD8 T-Zellantworten (Diaconu et al., 2012; Ramakrishna et al., 2009). Diese Studien zeigen, dass die Interaktion zwischen dem onkolytischen Virus und dem Immunsystem entscheidend für die effektive Entstehung von anti-tumoraler Immunität ist und somit essentiell zum Erfolg der Virotherapie beiträgt.

2.3 Antikörper-vermittelte anti-tumorale Immunreaktionen

Die effektive und Tumor-spezifische Aktivierung des Immunsystems zur Überwindung von Tumortoleranzmechanismen und zur Induktion lang anhaltender anti-tumoraler Immunantworten ist das übergeordnete Ziel in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen. Eine effiziente Methode zur direkten Zerstörung maligner Zellen und zur Unterstützung der Tumorzellerkennung durch Immunzellen bieten Tumor-spezifische Antikörper. Tumorasoziierte Antigene können eine natürliche Induktion spezifischer Antikörperantworten hervorrufen, die unter anderem als diagnostische Marker genutzt werden (Frieze et al., 2016; Reuschenbach et al., 2009). Humorale Immunantworten sind zudem in der Lage direkt, über Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) oder indirekt über Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) Tumorzellen zu zerstören. Um diese Mechanismen effektiv für die Tumorthherapie

nutzbar zu machen, wurden verschiedene rekombinante Antikörper etabliert, die Tumor-spezifische Strukturen erkennen und darüber eine anti-tumorale Funktion ausüben (Hsu et al., 2010; Pahl et al., 2012; Srivastava et al., 2013). Solche therapeutischen, monoklonalen Antikörper (mAbs) stellen ein vielversprechendes Agens zur Bekämpfung von Tumorzellen dar. Dies belegen Studien mit einer Vielzahl verschiedener Antikörper, die mittlerweile für die humane Tumorthherapie zugelassen wurden. Bekannte Beispiele repräsentieren der anti-CD20 Antikörper Rituximab zur Therapie maligner Lymphome und der anti-EGFR Antikörper Alemtuzumab für die Therapie chronischer lymphatischer Leukämie (CLL). Beide mAbs sind in der Lage, durch Induktion von Effektormechanismen, wie Komplement-abhängiger Zytotoxizität (CDC) oder die Aktivierung Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC), die Lyse von Zielzellen zu induzieren (Beum et al., 2008; Dall'Ozzo et al., 2004; Di Gaetano et al., 2003; Golay et al., 2004).

2.3.1 Induktion Komplement-abhängiger Zytotoxizität

Durch die Bindung von Faktoren des Komplementsystems an den Fc-Teil von Antikörpern können verschiedener Effektormechanismen aktiviert werden, hierzu gehört unter anderem die Aktivierung des Komplementsystems. Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird dabei vorwiegend durch Immunglobulin M (IgM) und zu einem kleinen Teil durch IgG vermittelt. Hierbei erfolgt zunächst die Opsonisierung von Antigenen durch diese Antikörper, die im Anschluss in der Lage sind, über ihren Fc-Teil Faktoren des Komplementsystems zu binden und dadurch die Komplementkaskade zu aktivieren. Diese Aktivierung resultiert letztendlich in der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC), der durch die Perforierung der Zellmembran zur Lyse der Zelle führt (Morgan, 1999; Nesargikar et al., 2012). Verschiedene Spaltungsprodukte einzelner Komplementfaktoren, die während der Komplementkaskade entstehen, üben zudem chemotaktische Funktionen aus. Diese sind unter anderem in die Aktivierung von B- und T-Zellen involviert (Morgan et al., 1982, 1985).

2.3.2 Induktion Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC)

Eine weitere durch Antikörper-vermittelte Effektorfunktion, die in der Lyse von Zielzellen resultiert, stellt die ADCC (Antikörper-abhängiger zellvermittelte Zytotoxizität) dar. ADCC beschreibt den Vorgang der aktiven Zelllyse von Antikörper-markierten Zellen durch die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems. Die Induktion von ADCC wird hauptsächlich durch IgG-Antikörper vermittelt. Diese erkennen und binden spezifische Antigene auf der Zielzelle und können anschließend über ihren Fc-Teil Effektorzellen aktivieren, die über Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs) verfügen. Hierzu gehören unter anderem neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die durch die Expression des Fc γ RI humane IgG1 und IgG3 binden (im murinen System IgG1 und IgG2a). Diese Bindung resultiert anschließend in Phagozytose der

Zielzelle (Nimmerjahn und Ravetch 2008). Vorrangig erfolgt ADCC jedoch über die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dies wird vorwiegend über die Interaktion des Fc-Teils des humanen IgG1 und IgG3 (murinen IgG1 und IgG2a) mit dem NK-Zellrezeptor FcγRIIIa und/oder FcγRIIc vermittelt (Lanier et al., 1988; Morel et al., 1999). Diese Interaktion induziert die Aktivierung von NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität und Zytokinausschüttung, resultierend in der Lyse der Zielzelle (Smyth et al., 2005).

2.3.3 Induktion von CDC und ADCC durch therapeutische Antikörper

Die gezielte Induktion von CDC sowie ADCC durch therapeutische Antikörper stellt eine effektive Methode zur Therapie maligner Tumorerkrankungen mit hohem Potenzial dar (Hubert et al., 2011; Seidel et al., 2013). Ein Beispiel für eine effiziente Induktion beider Effektormechanismen *in vivo* stellt der bereits erwähnte mAb Retuximab dar. Studien konnten belegen, dass ein Teil der *in vivo* Aktivität von Retuximab auf der Induktion von CDC beruht (Di Gaetano et al., 2003). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Retuximab effizient dazu in der Lage ist, durch NK-Zellen-abhängige Induktion von ADCC opsonisierte Tumorzellen zu zerstören (Beum et al., 2008; Dall'Ozzo et al., 2004). Ein weiteres Beispiel für eine gleichzeitige Induktion von CDC sowie ADCC Mechanismen stellt der anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mAb Cetuximab dar. Cetuximab wird erfolgreich zur Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt und kann einerseits effizient ADCC durch NK-Zellaktivierung induzieren (Amaro et al., 2013; Pahl et al., 2012). Zudem ist Cetuximab nachweislich in der Lage, *in vivo* durch Aktivierung von Komplementfaktoren die Lyse von Zielzellen hervorzurufen (Hsu et al., 2010).

Diese und weitere Studien belegen die Effizienz sowohl mAb-vermittelter Induktion von CDC als auch ADCC Mechanismen für die Therapie maligner Tumorerkrankungen (Gennari et al., 2004; Imai et al., 2005; Nakano et al., 2009).

2.3.4 Immunstimulation und indirekte Induktion anti-tumoraler Immunantworten durch Immuncheckpointblockade

Eine vergleichsweise neue Klasse therapeutischer Antikörper für die Tumorimmuntherapie bilden mAbs zur Modulation der T-Zell sowie NK-Zellaktivität durch Inhibition sogenannter *Immune checkpoints*. Äußerst vielversprechende Resultate in klinischen Studien lieferten dabei Antikörper zur Aktivierung von T-Zellen durch Blockierung der inhibitorischen T-Zellrezeptoren CTLA 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) und PD-1 (*programmed cell death protein-1*) (Garon et al., 2015; Hodi et al., 2010). Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der T-Zellaktivierung und Inhibition von Autoimmunreaktionen. Tumorzellen können sich diese Toleranzmechanismen jedoch zu Nutzen machen, um einer effektiven T-Zellantwort zu entgehen. Dies erfolgt beispielsweise durch die Hochregulierung

der PD-L1 Expression auf der Tumorzelle. Durch die Interaktion von PDL-1 mit PD-1 auf der T-Zelle werden deren Effektorfunktionen entscheidend geschwächt (Freeman et al., 2000). Die Blockierung dieser inhibitorischen Signale durch entsprechende Antikörper kann somit die Selbsttoleranz gegenüber Tumorzellen reduzieren und wesentlich zur Induktion von Tumor-spezifischen T-Zellantworten beitragen (Sharma and Allison; Topalian et al., 2012). Studien mit anti-CTLA-4 sowie anti-PD-1 und anti-PD-L1 Antikörpern erzielten sehr gute klinische Erfolge (Eggermont et al., 2014; Garon et al., 2015; Postow et al., 2015; Schadendorf et al., 2015). Die Behandlung sowohl mit dem anti-CTLA-4 mAb Ipilimumab als auch den anti-PD-1 mAbs Pembrolizumab und Nivolumab resultierten teilweise in vollständigen Tumorremissionen (Addeo and Rinaldi, 2013; Ladwa and Atkinson, 2017). Mittlerweile sind verschiedene Antikörper für die Tumorthherapie zugelassen. Ipilimumab ist bisher nur für die Therapie des inoperablen bzw. metastasierten Melanoms zugelassen, während die anti-PD-1 mAbs Pembrolizumab und Nivolumab auch für andere Tumorentitäten eingesetzt werden dürfen. Dazu gehören beispielsweise das metastasierte nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) und das fortgeschrittene bzw. wiederkehrende Hodgkin Lymphom. Ein besonderer Erfolg konnte durch die generelle Zulassung von Pembrolizumab für Therapie solider Tumore mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität-Rate (MSI-H Tumore) oder Mismatch Reparatur Defizienz (dMMR) erzielt werden. MSI-H und dMMR Tumore zeichnen sich durch eine hohe Rate an somatischen Mutationen, resultierend in einer erhöhten Frequenz immunogener Neoantigene, aus und sind größtenteils sensitiv gegenüber Immuncheckpointblockade (Czink et al., 2017; Lau, 2015). Neben der Monotherapie mit Immuncheckpoint Inhibitoren werden vermehrt Studien durchgeführt, die die Wirkung von Kombinationstherapien untersuchen. Dazu gehören sowohl klassische Tumorthapien wie Chemo- oder Radiotherapie als auch andere Immuntherapien, wie beispielsweise onkolytischer Virotherapie (Hersh et al., 2011; Pfirschke et al., 2016; Takamori et al., 2017). Initiale Studien konnten beispielsweise eine synergistische Wirkung von Radiotherapie und PD-1 Blockade beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zeigen (Takamori et al., 2017). Die Radiotherapie-induzierten Hochregulation von PD-L1 auf den Tumorzellen ist hierbei mit einer verbesserten Wirkung der PD-1/PD-L1 Checkpointinhibition assoziiert (Takamori et al., 2017). Erste Daten zur Kombination des onkolytischen Virus T-Vec mit Ipilimumab deuten ebenfalls auf eine synergistische Wirkung mit erhöhter Effizienz im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien hin (Puzanov et al., 2016). Die Behandlung mit onkolytischen Viren trägt zur Induktion einer systemischen T-Zell-basierten Anti-Tumorimmunität bei (Kanerva et al., 2013; Tuve et al., 2009). Diese Induktion Tumor-gerichteter T-Zellantworten könnte durch gleichzeitige Immuncheckpointblockade deutlich unterstützt werden und in einem synergistischen Effekt beider Immuntherapien resultieren (Woller et al., 2015; Zamarin et al., 2014). Diese Studien zeigen das enorme Potenzial der Tumorummuntherapie und geben insbesondere für die Behandlung fortgeschrittener Tumorerkrankungen neue Hoffnung.

2.4 Der Rolle einzelner Immunzellpopulationen in Tumorsurveillance, Tumorprogression und Tumorthherapie

Das Immunsystem spielt eine essentielle Rolle bei der Tumorentstehung, für die Tumorprogression sowie für den Erfolg anti-tumoraler Therapien. Die Fähigkeit des Immunsystems im Rahmen der *Tumorsurveillance* das Tumorwachstum zu verhindern bzw. zu limitieren wurde bereits vor einigen Jahrzehnten postuliert (Burnet, 1970; Thomas, 1982). Mittlerweile konnte bestätigt werden, dass Zellen des Immunsystems in der Lage sind, Tumovorläuferzellen zu erkennen und diese Zellen zu eliminieren bevor sie klinisch evident werden. In Versuchen mit immundefizienten im Vergleich zu immunkompetenten Tumormausmodellen, konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten und die Ausschüttung von Interferon gamma (IFN γ) die Entwicklung von Tumoren unterbinden können (Shankaran et al., 2001). Im Rahmen dieser Versuche wurde deutlich, dass maligne Zellen, die in immunkompetenten Tieren dieser Immunkontrolle entgingen, weniger immunogene Tumore als maligne Zellen immundefizienter Tiere bildeten. Die natürliche Kontrolle des Immunsystems führt somit zu einer Selektion ‚immun-resistenter‘ Zellen (Shankaran et al., 2001). Ein weiterer Mechanismus, durch den eine effiziente Eliminierung von Zellen bereits im prämaligen Stadium erfolgen kann, bildet die *Senescence-Surveillance* (Kang et al., 2011). Infolge einer unnatürlichen Aktivierung von Onkogenen können Zellen den Zellzyklusarrest induzieren und seneszent werden. In einem murinen Modell des Leberzellkarzinoms (HCC) konnte gezeigt werden, dass prä maligne Hepatozyten seneszent werden und Chemo- und Zytokine sekretieren. Diese Ausschüttung führt zu einer CD4 T-Zell-abhängigen adaptiven Immunreaktion die zur Eliminierung der Zellen führt (Kang et al., 2011). Mittlerweile ist bekannt, dass auch andere Zellen des Immunsystems an der Tumorsurveillance beteiligt sind, darunter Natürliche Killer (NK) Zellen sowie NKT-Zellen (Smyth et al., 2000). Durch den Selektionsdruck des Immunsystems werden Zellen mit geringer Immunogenität selektiert (Shankaran et al., 2001; Svane et al., 1996), die einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Die während dieser *Equilibrium* Phase selektierten Zellen können im Anschluss im Rahmen der *Escape* Phase progressiv wachsende Tumor bilden (Dunn et al., 2002; Kim, 2007). Während der *Escape Phase* entwickeln Tumore effiziente Mechanismen um einer Immunkontrolle weiter zu entgehen (*cancer immunoediting*) (Kim et al., 2006). Hierbei führt unter anderem die Ausschüttung von löslichen Faktoren durch den Tumor zu einer Rekrutierung von Immunzellen mit immunmodulierenden Eigenschaften, die die Entstehung eines immunsuppressiven Tumormikromillieus fördern. Hierzu gehören eine Reihe an unreifen myeloiden Zellen, darunter Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), Myeloide Suppressor Zellen (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) und unreife dendritische Zellen (DCs). Es konnte gezeigt werden, dass TAMs unter anderem die Vaskularisierung des Tumors und ein invasives Tumorwachstum fördern (Lin and Pollard, 2007; Pollard,

2004; Ye et al., 2012). Zudem sind sie nachweislich an der Inhibition anti-tumoraler Immunantworten beteiligt und fördern dadurch die Tumorprogression (Chen et al., 2012; Daurkin et al., 2011). Neben den TAMs stellen insbesondere die MDSCs tumorinfiltrierende Zellen mit potenten Tumor-fördernden Eigenschaften dar. MDSCs repräsentieren eine Population unreifer, heterogener Zellen (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Peranzoni et al., 2010), die unter anderem mit der Ausschüttung von Molekülen in Verbindung gebracht werden, die essentiell zum Tumorwachstum und zur Tumovaskularisierung beitragen (Murdoch et al., 2008; Serafini et al., 2006). Des Weiteren inhibieren MDSCs die Triggerung Tumorantigen-spezifischer zytotoxischer CD8 T-Zellantworten (Gabrilovich et al., 2001; Kusmartsev et al., 2004; Nagaraj and Gabrilovich, 2008). Allgemein korreliert ein hoher Anteil an MDSCs bei malignen Tumorerkrankungen mit einer schlechten Prognose (Gabitass et al., 2011; Weide et al., 2014). Sie sind zudem in der Lage, die Proliferation von regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu induzieren und damit zur immunologischen Tumortoleranz weiter beizutragen (Serafini et al., 2008). Eine entsprechende Funktion wird auch unreifen/plastischen Dcs zugeordnet, die durch eine verminderte Fähigkeit zur Interferonausschüttung mit einer Expansion von Tregs in Verbindung gebracht werden konnten (Sisirak et al., 2012). Tregs gehören zu den CD4 T-Lymphozyten und üben wichtige Funktionen bei der Immunregulation sowie der damit zusammenhängenden Prävention vor Autoimmunerkrankungen aus, zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen (Fehérvari and Sakaguchi, 2004; Sakaguchi, 2004). Im Kontext einer Tumorerkrankung können sie jedoch die Induktion einer anti-tumoralen Immunreaktion entscheidend beeinträchtigen, indem sie die Aktivierung von Effektorzellen inhibieren. Entsprechende Studien in Tumorpatienten konnten belegen, dass Tumorspezifische Tregs die Induktion einer effektiven Tumor-Immunität verhindern und somit die Tumortoleranz begünstigen (Antony et al., 2005). Parallel dazu besteht eine Korrelation zwischen der Frequenz von regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe und einer negativen Prognose bzw. einem Fortschreiten der Erkrankung (Kono et al., 2006). Eine weitere T-Zellpopulation mit Tumor-förderndem Potenzial stellen CD4⁺ Th2 (T-Helfer) Zellen dar. Sie sind in der Lage, durch die Ausschüttung von Zytokinen die Entstehung von Metastasen zu fördern (Kobayashi et al., 1998) oder chronische Entzündungsreaktionen hervorzurufen, die mit der initialen Karzinogenese assoziiert sind (Osawa et al., 2006).

Während diese immunsuppressiven Zellpopulationen das Tumorwachstum begünstigen und eine effektive Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem behindern, gibt es auch Immzelltypen, die mit einer guten Prognose assoziiert sind und deren Zunahme im Verlaufe einer Tumorthherapie mit einem guten Ansprechen korrelieren. Hierzu gehören insbesondere zytotoxische CD8 T-Zellen, die unter anderem in Lage sind, entartete Zellen zu identifizieren und direkt zu eliminieren. Entscheidend hierfür ist die Expression von MHC I (Haupthistokompatibilitätskomplex I) auf der

Zelloberfläche, die mit dem T-Zellrezeptor der CD8 T-Zelle interagieren. Auf MHC I Molekülen werden Antigene aus dem Proteom der Zelle präsentiert, die im Anschluss vom Immunsystem als ‚eigen‘ oder ‚fremd‘ eingestuft werden. Neben Antigenen, die beispielsweise während einer Infektion der Zelle präsentiert werden, können auch veränderte Proteine im Rahmen einer malignen Erkrankung als fremd erkannt werden und eine T-Zellantwort hervorrufen, die zur Eliminierung der infizierten bzw. entarteten Zelle führt (Ostrand-Rosenberg et al., 1990; Tanaka et al., 1986; Topalian et al., 1989). Eine Korrelation zwischen einer hohen Frequenz tumorinfiltrierender CD8 T-Zellen und einer guten Prognose bzw. einem deutlich verlängerten Überleben konnte in Patienten mit verschiedensten malignen Tumoren unterschiedlichster Entität nachgewiesen werden (Clemente et al., 1996; Galon et al., 2006; Nakano et al., 2001). Hierzu zählen Tumore wie das Nierenkarzinom (Nakano et al., 2001), Kolonkarzinom (Guidoboni et al., 2001), maligne Melanom (Piras et al., 2005) sowie das Mammakarzinom (Ali et al., 2014). Weitere Studien konnten belegen, dass insbesondere die Verschiebung des Verhältnisse von CD8 zu CD4 T-Zellen zu Gunsten von CD8 T-Lymphozyten mit einer positiven Prognose und therapeutischem Ansprechen korreliert (Diederichsen et al., 2003; Huang et al., 2015; Sato et al., 2005). Der prognostische Faktor ist hierbei insbesondere mit einer relativen Reduktion von CD4⁺-Tregs im Verhältnis zu CD8 T-Zellen assoziiert (Gao et al., 2007; Preston et al., 2013; Sato et al., 2005).

Eine weitere Immunzellpopulation mit besonderem anti-tumoralem Potenzial repräsentieren tumorinfiltrierende Natürliche Killer (NK) Zellen. Sie sind in der Lage, maligne Zellen zu erkennen und direkt zu zerstören (Kim et al., 2000; Smyth et al., 2000). Im gesunden Zustand fungiert MHC I Expression auf der Oberfläche von Zellen als inhibitorisches Signal an die NK-Zelle, die Abwesenheit bzw. deutliche Reduktion von MHC I auf der Zelloberfläche von Tumorzellen (um der Erkennung durch CD8 T-Zellen zu entgehen (Seliger et al., 2001)) ermöglicht die Aktivierung von NK-Zellen (Kärre et al., 1986; Ljunggren and Kärre, 1990) und die Freisetzung zytotoxischer Moleküle. Der Zusammenhang zwischen einer hohen NK-Zellinfiltration im Tumorgewebe und einem verlängerten Überleben von Tumorpatienten konnte unter anderem für das Magenkarzinom (Ishigami et al., 2000), Nierenzellkarzinom (Remark et al., 2013) sowie das Lungenkarzinom (*squamous cell lung cancer*) (Villegas et al., 2002) gezeigt werden. Weitere Studien belegten die signifikante Inhibition des Tumorwachstums und insbesondere der Progression von Metastasen durch NK-Zell-vermittelte Perforin-Ausschüttung und dadurch induzierte Eliminierung von Tumorzellen (Brodbeck et al., 2014; Kim et al., 2000; Sodeur et al., 2009). Diese Daten zeigen, dass verschiedene Immunzelltypen das Tumormikromillieu entscheidend prägen und an der Malignität der Erkrankung sowie der Induktion bzw. Inhibition anti-tumoraler Immunantworten beteiligt sind.

2.5 Polysialinsäure als Tumor-assoziiertes Antigen

Polysialinsäure (PolySia) stellt ein Homopolymer aus α -2,8-verknüpften Sialinsäure Monomeren mit stark negativer Ladung dar und ist eine evolutionär hoch konservierte Zelloberflächenstruktur. Die Synthese erfolgt durch die Polysialyltransferasen ST8SialII (*alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2*) und ST8SialIV (*alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4*) (Nakayama et al., 1998). Hauptträgermolekül von PolySia in Säugetieren stellt das oberflächenständige neuronale Adhäsionsmolekül NCAM dar. NCAM-Interaktionen vermitteln im unmodifizierten Zustand Zell-Zelladhäsion und ermöglichen Zelldifferenzierung. Polysialylierung von NCAM, als posttranslationale Modifikation, führt durch die zunehmend negative Ladung des Moleküls zu einer vermehrten Repulsion der Zellen und blockiert damit die Differenzierung der Zellen (Johnson et al., 2005; Yang et al., 1992). Im Rahmen der embryonalen Entwicklung, insbesondere während der Entwicklung des Gehirns, wird PolySia in hohem Maße exprimiert, da es durch seine Adhäsions-reduzierende Eigenschaft zu einer hohen Plastizität beiträgt. Diese Plastizität ist unter anderem essentiell für die neuronale Zellmigration und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Synapsen und beim gerichteten Wachstum von Axonen (Gascon et al., 2007; Hildebrandt et al., 2007). Im adulten Stadium findet sich polysialyliertes NCAM in nennenswerten Mengen nur noch in begrenzten Regionen des Gehirns, die mit hoher Plastizität in Verbindung gebracht werden oder in Bereichen in denen Regeneration oder eine Umstrukturierung neuronaler Verbindungen stattfindet (Gascon et al., 2007). Hingegen wird PolySia auf der Zelloberfläche verschiedener maligner Tumore in hohem Maße reexprimiert. Hierzu gehören beispielsweise das Rhabdomyosarkom (Gluer et al., 1998), das Medulloblastom (Durbec et al., 1990), das Neuroblastom (Glick et al., 1991; Livingston et al., 1988), das nichtkleinzellige sowie das kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC/SCLC) (Miyahara et al., 2001; Tanaka et al., 2000, 2001), das maligne Astrozytom (Petridis et al., 2009) und der Wilms-Tumor (Roth et al., 1988). In etlichen Studien konnte in diesem Zusammenhang eine direkte Korrelation von PolySia-Expression und Malignität der Tumore gezeigt werden (Cheung et al., 2006; Tanaka et al., 2001; Wang et al., 2016). Starke PolySia-Expression und die dadurch verminderte Zelladhäsion ist hierbei assoziiert mit einem aggressiven und stark invasiven Tumorwachstum mit gesteigerter Metastasierung (Gong et al., 2016; Schreiber et al., 2008; Trouillas et al., 2003). Die Exklusivität der PolySia-Expression im adulten Stadium macht PolySia jedoch zu einem hervorragenden Ziel in der Tumorthherapie (Falconer et al., 2012; Livingston et al., 2005). Durch die Begrenzung der Expression auf wenige Teilbereiche des Gehirns und die starke Reexpression auf malignem Gewebe, ist eine gezielte Therapie von Tumorzellen mit minimaler Schädigung gesunder Zellen möglich.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Einsatz onkolytischer Viren für die Therapie solider Tumore stellt eine vielversprechende Behandlungsmethode dar. Es entstehen jedoch starke zelluläre sowie humorale Immunantworten gegen das therapeutische Virus, die eine vollständige Infektion und Zerstörung des Tumors verhindern.

Im Rahmen des Dissertationsprojekts sollten virus-gerichtete humorale Immunantworten erstmalig durch molekulares *Retargeting* für die Tumorthherapie nutzbar gemacht werden. Hierfür sollten bispezifische Adapterproteine, bestehend aus einer Antikörper-bindenden Domäne und einem Tumorspezifischen Liganden, eingesetzt werden, die das *Retargeting* anti-viraler Antikörper gegen Tumorspezifische Zielstrukturen ermöglichen, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen.

In dieser Dissertation sollte zunächst ein im Rahmen meiner Masterarbeit kloniertes, rekombinantes Adapterprotein untersucht werden, das ein Antikörperfragment (scFv) gegen PolySia für das *Retargeting* von PolySia-exprimierenden Tumoren sowie die DE1-Domäne des adenoviralen Hexonproteins für die Bindung anti-adenoviraler Antikörper enthält. Zunächst sollte die Funktionalität des Adapterproteins *in vitro* bestätigt und genauer charakterisiert werden, u.a. durch Quantifizierung der Bindung anti-adenoviraler Antikörper. Der therapeutische Effekt sollte in verschiedenen, immunkompetenten Tumormodellen der Maus anhand der Inhibition des Tumorwachstums und des Überlebens ermittelt werden. Neben einem bereits existierenden Tumormodell, sollten auch weitere, in der Immuntherapie gut etablierte Tumorzelllinien herangezogen werden, um PolySia-exprimierende Varianten zu generieren und als Modell zu nutzen. Die Belastbarkeit dieses Therapiekonzepts sollte weiter bestätigt werden, unter anderem durch Untersuchungen der Wirkung des Antikörper-*Retargetings* in einem Tumormodell mit einem transgenen Lebertumor *in situ* und durch Untersuchungen in Mäusen nach länger zurückliegender Antikörperstimulation. Zudem sollte die allgemeine Übertragbarkeit des Ansatzes auf eine alternative Zielstruktur validiert werden, beispielsweise gegen das Karzinoembryonales Antigen, das auf verschiedenen gastrointestinalen Tumoren hochreguliert ist. Anschließend sollten die dem therapeutischen Effekt zugrundeliegenden Wirkmechanismen ermittelt werden. Zunächst sollten durchflusszytometrische Untersuchung tumorinfiltrierender Immunzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapie dazu dienen, Kandidaten für relevante Immunzellpopulationen identifizieren zu können, deren funktionelle Relevanz durch Depletionsversuche *in vivo* bestätigt werden sollte. Letztendlich sollte das Potenzial des Antikörper-*Retargetings* im Kontext weiterer Immuntherapien untersucht werden. Hierbei sollte sowohl die Wirksamkeit einer Sequenztherapie aus initialer onkolytischer Virotherapie gefolgt vom Antikörper-*Retargeting* als auch eine synergistische Wirkung dieses Ansatzes mit einer PD-1 Immuncheckpointblockade ermittelt werden, um das Potential dieses Therapiekonzepts zur Induktion und Amplifikation anti-tumoraler T-Zellantworten zu belegen.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Untersuchung des Adapterproteins DE1scFvpSia zum molekularen *Retargeting* anti-adenoviraler Antikörper gegen solide Tumore

Die Therapie von Tumorerkrankungen mit onkolytischen Adenoviren ist eine innovative und vielversprechende Behandlungsmethode. In Folge der Virotherapie entstehen jedoch starke Immunreaktionen gegen die viralen Vektoren. Diese stehen einer vollständigen Infektion und viralen Eliminierung des Tumors *in vivo* entgegen. Insbesondere die Induktion starker humoraler Immunantworten limitiert die therapeutische Effizienz wiederholter Applikation und die hohe Seroprävalenz häufig die Wirksamkeit der initialen Virotherapie (Chirmule et al., 1999; Yang et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand verschiedener therapeutischer Ansätze überprüft werden, ob anti-virale humorale Immunantworten effektiv gegen Tumorzellen gerichtet werden können und ob dieses ‚*Retargeting*‘ einen therapeutischen Nutzen gegen solide Tumore erzielen kann. Hierzu sollte zunächst ein bispezifisches Adapterprotein zum *Retargeting* anti-adenoviraler Antikörpern genutzt werden, das im Rahmen eigener Vorarbeiten kloniert wurde (Masterarbeit: Etablierung eines molekularen Adapters zum *Retargeting* humoraler, virusspezifischer Immunreaktionen gegen solide Tumore. Niemann J., 2013, Technische Universität Braunschweig). Als Tumorigand enthielt dieses Adapterprotein die etablierte scFv-Domäne des murinen Antikörpers mAb735, der hochaffin an PolySia binden kann (Frosch et al., 1985). Eine hohe Expression von PolySia findet sich beim Menschen auf verschiedenen malignen Tumoren wie beispielsweise dem kleinzelligen Lungenkarzinom (Tanaka et al., 2001). Ansonsten wird PolySia im adulten Stadium nur noch in vereinzelt Regionen des Gehirns exprimiert, die eine erhöhte Plastizität aufweisen (Gascon et al., 2007). Eine wesentliche Anforderung an ein Adapterprotein für ein Antikörper-*Retargeting* war neben der effektiven Bindung an das tumorspezifische *Target* die Fähigkeit, eine substantielle Menge an anti-viralen Antikörpern binden zu können, die im Rahmen von Infektionen mit dem humanen Adenovirus Serotyp 5 oder einer Virotherapie mit onkolytischen Adenoviren des gleichen Serotyps entstehen.

3.1.1 Quantifizierung der Bindung anti-adenoviraler Antikörper an die DE1-Domäne des Adenovirus-Hexon bzw. das Adapterprotein DE1scFvpSia

Es ist bekannt, dass das Adenovirus 5 (Ad5) Kapsid das wesentliche Ziel humoraler Immunreaktionen gegen das Virus darstellt (Gahery-Segard et al., 1998). Der Hauptteil der anti-adenoviralen Antikörper ist, neben dem Fiberprotein, insbesondere gegen das Haupthüllprotein Hexon gerichtet (Sumida et al., 2005). Innerhalb der komplexen Struktur des Ad5-Hexons werden als Hauptziele die drei *Loop*-Domänen des Proteins erkannt (DE1, FG1, FG2), die an der Kapsidoberfläche des Virus lokalisiert sind (Abbildung

3.1 (A)) (Crawford-Miksza and Schnurr, 1996). Alle drei Domänen weisen zudem im Gegensatz zum vollständigen Ad5 Hexon eine relativ kleine Proteingröße von jeweils unter 30 kDa im Vergleich zum Ad5-Hexonmonomer mit ca. 110 kDa auf (Rux et al., 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese Hexon-Loop-Domänen als Antikörper-bindender Teil eines bispezifischen Adapters geeignet. Vorarbeiten haben gezeigt, dass sich von den untersuchten Kandidaten DE1, FG1 und FG2 nur die DE1-Domäne in ausreichender Menge darstellen und mittels His-Tag-Affinitätschromatographie aufzureinigen ließ. Dementsprechend wurden alle nachfolgenden Versuche nur mit dem DE1-Protein als Antikörper-bindende Domäne durchgeführt (Aufbau siehe Abbildung 3.1 (B)). Die durchgeführten Vorversuche zeigten zudem, dass die lösliche DE1-Domäne in der Lage ist, anti-adenovirale Antikörper aus dem Serum Ad5-immunisierter Mäuse zu binden. In einem weiteren Versuch sollte nun die Vorbehandlung des Serums mit löslichem DE1 ermöglichen, den Anteil der anti-adenoviralen Antikörper, die für ein *Retargeting* mit DE1 genutzt werden können, zu quantifizieren (Abbildung 3.1(C)).

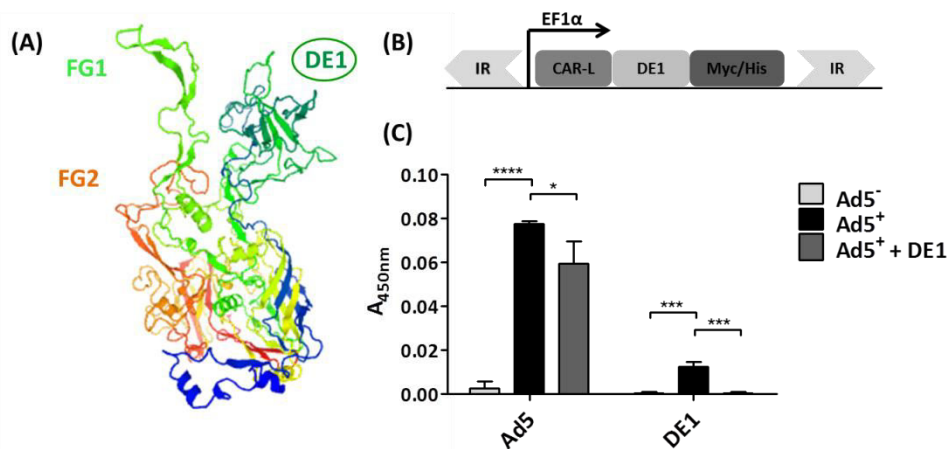


Abbildung 3.1: Die Ad5 Hexon Domäne DE1 ist ein Hauptziel anti-adenoviraler IgGs

(A) Struktur des adenoviralen Hexons mit den Loop-Domänen DE1, FG1 und FG2 (Abb. erstellt unter swissmodel.expasy.org, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Artimo et al., 2012); (B) Schematische Darstellung des DE1-Expressionskonstrukts mit Leaderpeptid aus dem Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR-L), der DE1-Domäne und Myc/His-Tag unter Kontrolle des EF1 α -Promotors; (C) ELISA-Analyse zur Bindung des aufgereinigten DE1-Proteins durch anti-adenovirale IgGs. ELISA-Platten wurden mit inaktivierten Ad5-Partikeln bzw. DE1-Protein beschichtet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Serum naiver (Ad5⁻, n=2), Ad5-immunisierter Mäuse (Ad5⁺, n=5) oder Serum immunisierter Mäuse vorbehandelt (*in vitro*) mit DE1-Protein (Ad⁺ + DE1, n=5) zur Depletion DE1-spezifischer IgGs. Die Bindung von Maus-IgGs wurde durch einen sekundären anti-Maus-IgG quantifiziert. *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001

Die ELISA-Daten zeigen, dass die DE1-Domäne spezifisch durch Antikörper im Serum immunisierter Mäuse erkannt wird, während keine Antikörperbindung beim Einsatz von Serum naiver Tiere zu beobachten ist. Die Signalstärke entsprach dabei ca. 1/5 des Signals der gesamten Virushülle (inaktiviertes Ad5), bei der vorausgesetzt werden kann, dass nahezu sämtliche anti-viralen IgGs gebunden werden. Im Einklang damit konnte durch Vorinkubation des Serums Adenovirus-immunisierter Mäuse mit dem DE1-Protein (Ad5⁺ + DE1) der Anteil an Virus-bindenden Antikörpern signifikant reduziert

werden. Dies zeigte sich durch die Zugabe dieses vorbehandelten Serums zu Ad5 beschichteten Platten im Vergleich zu Serum, das nicht mit DE1 vorbehandelt wurde ($Ad5^+$). Das Signal minderte sich hierbei um ca. 1/4 des Vergleichswertes. Wurde dieses vorinkubierte Serum auf DE1-beschichtete Wells gegeben, war keine Bindung von IgGs mehr messbar, wodurch davon auszugehen ist, dass die zugegebene Menge ausreichend ist, um sämtliche DE1-spezifischen IgGs im Serum zu depletieren. Diese Daten zeigen zusammenfassend, dass die DE1-Domäne ein wichtiges Antikörperziel der Virushülle darstellt und im Zusammenhang mit der guten Darstellbarkeit dieser Domäne ein gut geeignetes Ziel anti-viraler Antikörper innerhalb eines Adapterproteins bilden kann.

Im Folgenden sollte mittels ELISA überprüft werden, ob diese Ergebnisse auch im Kontext eines vollständigen bispezifischen Adapters reproduziert werden können. (Abbildung 3.2).

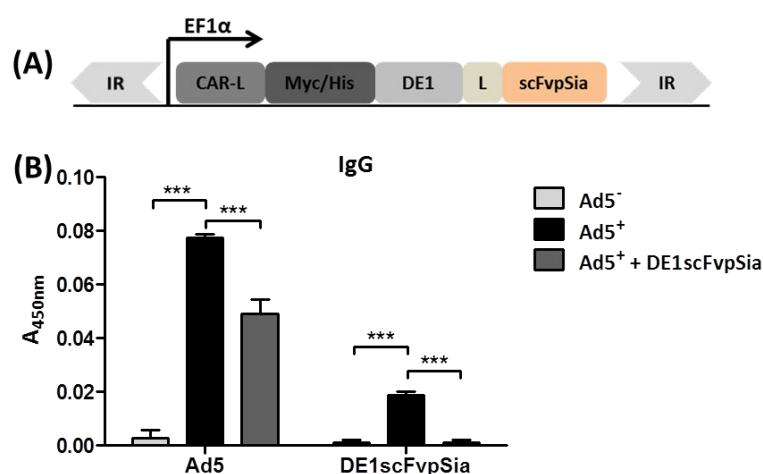


Abbildung 3.2: DE1-Domäne bindet effizient anti-adenovirale IgGs im Kontext eines bispezifischen Adapters

(A) Schematische Darstellung des Adapterproteins. Es enthält ein Leaderpeptid (CAR-L), tags zur Detektion und Aufreinigung und die DE1-Domäne verknüpft mit dem scFv-Antikörperfragment gegen PolySia (scFvP5ia) aus dem mAb 735 über einen Serin/Glycin-Linker (L) **(B)** Die Bindung anti-adenoviraler IgGs an das aufgereinigte Adapterprotein DE1scFvP5ia: ELISA-Platten wurden mit Ad5 bzw. DE1scFvP5ia-Protein gecoatet und im Anschluss mit Blutserum aus naiven ($Ad5^-$, $n=2$), Ad5-immunisierten Mäusen ($Ad5^+$, $n=5$)

oder Serum Ad5-immunisierten Mäuse vorinkubiert (*in vitro*) mit DE1scFvP5ia ($Ad5^+ + DE1scFvP5ia$, $n=5$) versetzt. Die Bindung von Maus-IgGs wurde wie zuvor in Abbildung 3.1 beschrieben detektiert und quantifiziert. *** $p < 0,001$

Die ELISA-Daten zeigen eine deutliche Bindung des Adapterproteins durch murine IgGs im Serum Ad5-immunisierter Mäuse. Zudem konnte durch Vorinkubation des Serums mit dem Adapterprotein eine signifikante Abnahme freier Ad5-bindender Antikörper erzielt werden, erkennbar durch die Signalabnahme im Vergleich zum Einsatz unbehandelten Serums. Die Daten bestätigen, dass die DE1-Domäne ohne Funktionsverlust in ein bispezifisches Adaptermolekül integriert werden kann.

Studien konnten belegen, dass die Loop-Domänen des Ad5-Hexons von allen 4 Subklassen an IgGs erkannt werden (Gahéry-Ségard et al., 1997). Diese IgG-Subtypen unterscheiden sich untereinander jedoch deutlich in ihrem Potenzial verschiedene Effektormechanismen zu induzieren (zur Übersicht siehe: Lux et al., 2010; Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Hierbei sind im murinen System IgG2a und IgG2b in der Lage, sowohl Faktoren des Komplementsystems als auch verschiedene Effektorzellen über ihren Fc-Teil zu rekrutieren und gegen opsonierte Zellen zu aktivieren, während IgG1 und IgG3 vorwiegend Aktivatoren der Komplementkaskade darstellen, daher wurde exemplarisch die Bindung der

IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a an das Adapterprotein näher untersucht. Hierzu wurde, entsprechend den bisherigen Analysen, die Bindung von Antikörpern an das Adapterprotein (DE1scFvpSia) vergleichend zur Virushülle (inaktivierter Ad5) in ELISA-Analysen quantifiziert.

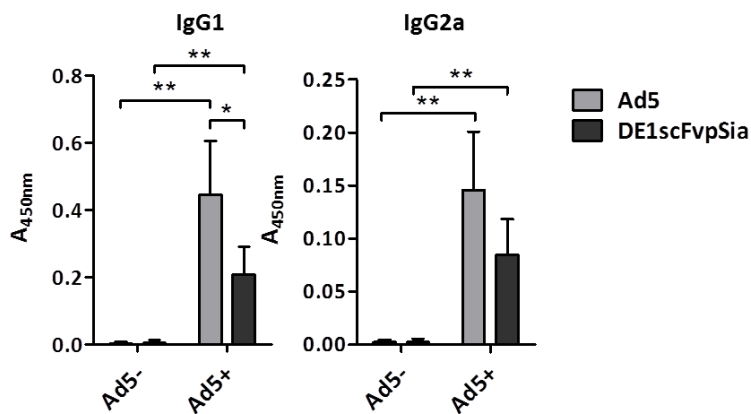


Abbildung 3.3: Der Adapter DE1scFvpSia wird von anti-adenoviralen IgG1 und IgG2a Antikörpern erkannt

Die Bindung der anti-adenoviralen IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a an das aufgereinigte Adapterprotein DE1scFvpSia: ELISA-Platten wurden mit Ad5 bzw. DE1scFvpSia-Protein gecoatet und im Anschluss mit Blutserum naiver (Ad5-; n=2) oder Ad5-immunisierter Mäuse (Ad5+; n=5) inkubiert. Die Bindung von Maus-IgG1s bzw. IgG2a wurde durch den Einsatz sekundärer anti-Maus IgG1 bzw. IgG2a detektiert und quantifiziert. ** p<0,01, *p<0.05

Das Ergebnis der ELISA-Analyse zeigt, dass die DE1-Domäne des Adapters von beiden IgG-Subklassen in hohem Maße erkannt wird. Der Vergleich mit der Bindung des Gesamtvirus (Ad5) macht zudem deutlich, dass ein substantieller Teil der gesamten IgG1- und IgG2a-Antwort gegen das Virus DE1-spezifisch ist. Die IgG-Subgruppen-Analyse verdeutlicht, dass die DE1-Domäne ein Hauptziel Adenovirus-spezifischer IgG1 und IgG2a ist. Diese IgG-Subklassen könnten *in vivo* sowohl Faktoren des Komplementsystems als auch Effektorzellen aktivieren und damit in der Lage sein, die Eliminierung von Tumorzellen zu induzieren.

Nachdem die Antikörperbindung des Adapterproteins genauer charakterisiert werden konnte, sollte die Bindung des Adapters an verschiedene natürlich PolySia-positive humane Tumorzellen überprüft werden. Zudem sollte eine Bindung an murine PolySia exprimierende Tumorzellen validiert werden, die im weiteren Verlauf für therapeutische Studien in syngenem Transplantmodellen genutzt werden sollten. Es wurden zunächst die drei PolySia-positiven humanen Tumorzelllinien H146 (Lungenkarzinom), IMR32 (Neuroblastom) und TE671 (Rhabdomyosarkom) auf die Bindung durch den aufgereinigten Adapter mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Die Zellen wurden mit aufgereinigtem Adapter inkubiert und im Anschluss wurde ein α -c-myc Antikörper zur Detektion von gebundenem Adapter auf der Zelloberfläche verwendet (Abbildung 3.4 oben).

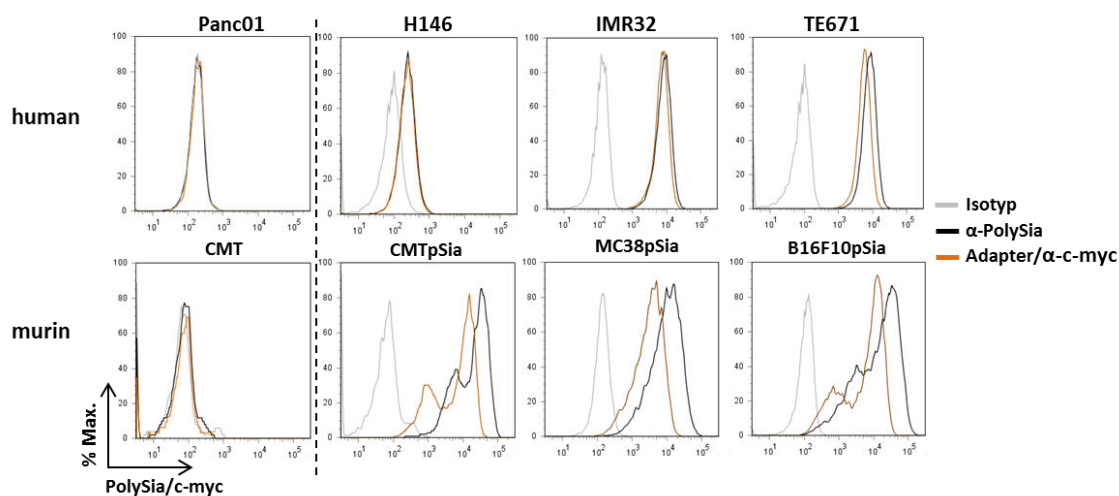


Abbildung 3.4: Spezifische Bindung des Adapters an PolySia-positive Tumorzellen

Die Bindung des Adapterproteins an die PolySia-positiven humanen Zelllinien H146, IMR32 und TE671 und die stabil transduzierten PolySia-exprimierenden murinen Zelllinien CMTpSia, MC38pSia und B16F10pSia wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Die Zellen wurden mit aufgereinigtem Adapterprotein DE1scFvpSia und anschließend einem α -c-myc Antikörper zur Detektion des Adapters auf der Zelloberfläche oder mit einem Kontrollantikörper gegen PolySia und jeweils einem sekundären PE-gekoppelten Antikörper inkubiert. Als Negativkontrollen dienten die PolySia-negativen humanen Panc01-Zellen und untransduzierte murine (PolySia-negative) CMT-Zellen.

Die FACS-Analyse konnte eine spezifische Bindung des Adapters an alle drei PolySia-positiven humanen Zelllinien bestätigen, während die PolySia-negativen Panc01-Zellen nicht erkannt wurden. Die Signalstärke entsprach dabei nahezu der des entsprechenden Kontrollantikörpers gegen PolySia (735(Frosch et al., 1985)), aus dem die scFv-Domäne des Adapters stammt. Um im Folgenden zur Bestätigung der therapeutischen Wirksamkeit des Adapters und der anschließenden Analyse und Verdeutlichung komplexer immunologischer Zusammenhänge in verschiedenen Mausmodellen arbeiten zu können, wurde die Adapter-Bindung an PolySia-exprimierende murine Zellen validiert. Hierfür wurde zunächst die PolySia-positive Zelllinie CMTpSia (Kloos et al., 2015) zur Analyse herangezogen. CMTpSia basiert auf der Lungenkarzinomzelllinie CMT64 und verfügt über eine stabile PolySia-Expression, erlangt durch retrovirale Transduktion mit der murinen Polysialyltransferase IV (PST IV). Die spezifische Bindung an CMTpSia konnte bereits im Kontext eigener Vorarbeiten gezeigt werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zusätzlich die zwei etablierten murinen Tumorzelllinien MC38 (Kolonkarzinom) und B16F10 (Melanom) stabil mit der murinen PST IV transduziert. MC38 und B16F10 wurden als zusätzliche Zellen herangezogen, da sie gängige Modelle in der Immuntherapie repräsentieren und in Folgeversuchen zur Bestätigung der therapeutischen Effizienz einer Adapter-basierten Behandlung von Tumoren genutzt werden sollten. Die PolySia-Expression sowie vergleichend die Erkennung der Zellen durch das Adapterprotein DE1scFvpSia wurde wie zuvor beschrieben mittels FACS überprüft (Abbildung 3.4 unten). Die FACS-Daten zeigen, dass die transduzierten murinen Zellen eine starke PolySia-Expression aufweisen, die vergleichbar mit denen der humanen PolySia-exprimierenden Zellen ist. Zudem konnte

bestätigt werden, dass eine zuverlässige und spezifische Bindung aller drei PolySia-positiven murinen Zelllinien durch das Adapterprotein erfolgt. Die PolySia-Bindung war dabei im Vergleich zum Kontrollantikörper nur geringfügig schwächer, währenddessen PolySia-negative, untransduzierte CMT-Zellen nicht erkannt wurden. Zusammen mit der starken Bindung durch anti-adenovirale Antikörper bildet das generierte Adapterprotein ein geeignetes Werkzeug, um das *Retargeting* viraler Antikörper gegen die Zelloberfläche von Tumorzellen untersuchen zu können.

In einem Vorversuch wurde die Komplementaktivierung gegen PolySia-positive Tumorzellen *in vitro* untersucht. Hierbei erfolgte die Verwendung Luciferase-exprimierender MC38pSia-Zellen (MC38pSiaLUC), um die Lyse der Zellen durch Freisetzung von Luciferase in den Überstand quantifizieren zu können. Zur Analyse wurden die Zellen mit aufgereinigtem Adapterprotein in Anwesenheit von unbehandeltem sowie Hitze-inaktiviertem Serum (zur Deaktivierung der Komplementfaktoren) Ad5-immunisierter Mäuse inkubiert und im Anschluss die Luciferaseaktivität im Überstandes bestimmt. Es konnten in diesen Vorversuchen jedoch keine Einflüsse von Komplement beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Untersuchungen zum therapeutischen Potenzial eines Adapter-vermittelten

Antikörper-Retargetings

Die Funktionalität des entwickelten Adapters (DE1scFvpSia) konnte bezüglich einer effektiven Bindung anti-adenoviraler Antikörper sowie der spezifischen Erkennung PolySia-positiver Zellen *in vitro* bestätigt werden. Um das prinzipielle Potenzial des Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings* für eine anti-tumorale Wirkung zu untersuchen, wurde in Vorarbeiten ein Pilotversuch mit Adapter (DE1scFvpSia)-exprimierenden Tumorzellen im subkutanen Tumormodell der Maus durchgeführt (Abbildung 3.5). Die Adapter-exprimierenden bzw. Kontrollprotein (DE1)-exprimierenden Zellen für diesen *Proof of principle* Versuch wurden durch stabile Transfektion, mittels des Sleeping Beauty(SB)-Transposonsystems (Carlson et al., 2005) etabliert (CMTpSiaDE1scFvpSia/ CMTpSiaDE1). Weiterführend wurden diese Zellen zur Etablierung subkutaner Tumore in naiven sowie zuvor mit Ad5-immunisierten Mäusen (zur Induktion anti-adenoviraler Antikörper) eingesetzt und das Tumorwachstum und Überleben dokumentiert (Abbildung 3.5 (A) und (B)).

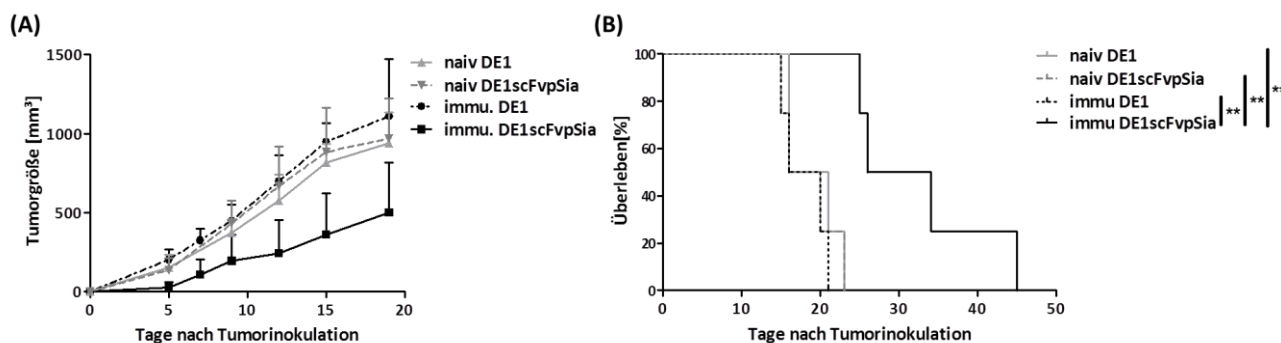


Abbildung 3.5: Intrinsische Expression des Adapters durch PolySia-positive Tumore resultiert in einem verzögerten Tumorwachstum in Ad5-immunisierten Mäusen

6 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (n=4) wurden durch zweimalige intravenöse Injektion mit 1×10^9 infektiösen Partikeln Ad5 im Abstand von 7 Tagen immunisiert oder naiv belassen. Sieben Tage nach der zweiten Virusinjektion wurden subkutane Tumore durch die Injektion von 1×10^7 CMTpSia-Zellen etabliert. Zur Etablierung wurden Adapter (DE1scFvpSia)- bzw. Kontrollprotein (DE1)-exprimierende Zellen verwendet. **(A)** Das Tumorwachstum (Abb. entnommen aus der Masterarbeit: Etablierung eines molekularen Adapters zum Retargeting humoraler, viruspezifischer Immunreaktionen gegen solide Tumoren, Julia Niemann, 2013) und **(B)** das in der Dissertation ermittelte Überleben wurde dokumentiert (Abbruchkriterien siehe 5.7.11). Mittleres Überleben in Tagen: naiv DE1: 18,5; naiv DE1scFvpSia: 18; immunisiert DE1: 18; immunisiert DE1scFvpSia: 30. ** $p < 0,01$

Beide Zelllinien bildeten in naiven Mäusen innerhalb von 5 Tagen sichtbare subkutane Tumore und wuchsen mit einer vergleichbaren Rate progressiv weiter. Das mittlere Überleben beider Gruppen war mit 18,5 Tagen in der DE1-exprimierenden und 18 Tagen in der Adapter-exprimierenden Gruppe nahezu vollständig kongruent. Mit einer vergleichbaren Wachstumsrate wuchsen zudem die Tumore der immunisierten Gruppe mit DE1-exprimierenden Zellen, hier betrug das mittlere Überleben ebenfalls 18 Tage. Diese Beobachtung zeigt, dass die Expression der Antikörper-bindenden Domäne allein in unmittelbarer Tumornähe nicht für eine anti-tumorale Wirkung ausreicht. Ein deutlich verändertes Tumorwachstum zeigte sich nur in der Ad5-immunisierten Gruppe mit Adapter-exprimierenden Zellen. Hier war ein deutlich verzögertes Tumorwachstum zu beobachten, welches das mittlere Überleben auf 30 Tage anheben konnte und somit im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen zu einem signifikant verlängerten Überleben führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Adapter-vermitteltes *Retargeting* Virus-spezifischer Antikörper *in vivo* in der Lage ist, das Tumorwachstum zu inhibieren und das Überleben signifikant zu verlängern. Zudem konnte durch diese Daten bestätigt werden, dass die Lokalisierung der Antikörper auf der Zelloberfläche, mittels einer entsprechenden Zell-bindenden Domäne essentiell für die Wirksamkeit ist. Dieser *Proof of Principle* Versuch mit Adapter-exprimierenden Tumorzellen konnte einen inhibitorischen Effekt des Antikörper-*Retargetings* auf das Tumorwachstum *in vivo* zeigen. Um das Antikörper-*Retargeting* als therapeutische Maßnahme einsetzen zu können, muss jedoch überprüft werden, ob eine sichere und gleichzeitig wirksame Applikation im Rahmen einer Tumorbehandlung möglich ist. Diese Fragestellung sollte durch die Administration des aufgereinigten Adapters in Tumor-tragende Ad5-immunisierte Mäuse in Form einer lokalen oder vergleichend einer systemischen Applikation adressiert werden.

3.2.1 Ermittlung des optimalen Applikationswegs des Adapters

Um das Adapter-vermittelte *Retargeting* Virus-spezifischer Antikörper als therapeutische Intervention zur Tumorbehandlung einsetzen zu können, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, wie effizient eine intratumorale (lokale) bzw. intravenöse (systemische) Applikation des Adapters zur Behandlung subkutaner Tumore ist. Neben der Evaluation der therapeutischen Wirkung sollte bei diesem Versuch zudem auf mögliche Nebenwirkung der Behandlung geachtet werden. Bei der Applikation des Adapters wird durch die integrierte DE1-Domäne ein virales Protein verabreicht. Dieses könnte in Ad5-immunisierten Individuen starke Immunreaktionen auslösen.

Um diese Fragestellungen zu adressieren, wurden erneut zur Generierung Virus-spezifischer Antikörper Mäuse mit Adenovirus (Ad5) immunisiert, subkutane CMTpSia-Tumore etabliert und an Tag 7 nach Tumordinokulation mit 50 µg aufgereinigtem Adapterprotein intratumoral (i.t.) oder intravenös (i.v.) behandelt (Abbildung 3.6 (A)). Die behandelten Tiere wurden unmittelbar nach der Adapterapplikation über die folgenden Stunden stetig kontrolliert und beobachtet. Hierbei wurde auf Anzeichen einer akuten Toxizität geachtet, dazu zählt vor allem ein verändertes Allgemeinbefinden. Es waren jedoch unabhängig von der Applikationsart keine entsprechenden Anzeichen einer Unverträglichkeit erkennbar. Alle Mäuse verhielten sich zu jedem Zeitpunkt der Nachkontrolle unauffällig. Dies lässt vermuten, dass sowohl i.t. als auch i.v. eine sichere Applikation des Adapters erfolgen kann.

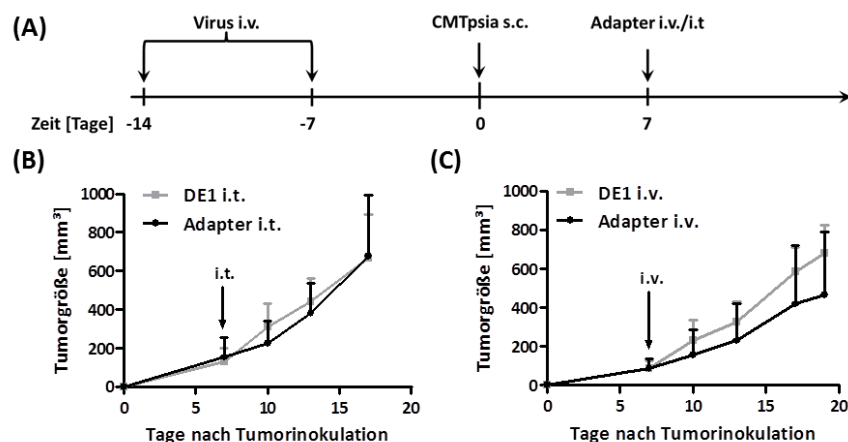


Abbildung 3.6: Intravenöse Adapterapplikation inhibiert das Wachstum subkutaner Tumore effektiver als intratumorale Applikation

(A) C57BL/6 Mäuse (n=6) wurden durch zweifache i.v. Injektion (Tag -14 und -7) gegen Ad5-immunisiert und subkutane Tumore durch Injektion von CMTpSia-Zellen etabliert (Tag 0). Sieben Tage nach Tumordinokulation erfolgte die Therapie mit 50 µg Adapterprotein

(DE1scFvpSia) oder Kontrollprotein (DE1) i.t. bzw. i.v. (B) Verlauf des Tumorwachstums nach i.t. Injektion. (C) Verlauf des Tumorwachstums nach i.v. Injektion.

Hinsichtlich der therapeutischen Effizienz konnte keine veränderte Tumorprogression nach i.t. Adapterbehandlung im Vergleich zu Kontrolltieren, die das funktionslose Protein DE1 erhielten, festgestellt werden (Abbildung 3.6(B)). Im Gegensatz dazu war bei den intravenös behandelten Tieren ein verzögertes Tumorwachstum nach Adapterbehandlung zu beobachten (Abbildung 3.6 (C)). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur in einem Teil der therapierten Tiere, sodass keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Um zu überprüfen, ob die Tumormasse zu Therapiebeginn einen Einfluss auf den

therapeutischen Erfolg im Rahmen der hier durchgeführten i.v. Behandlung hat, wurde das Tumorstwachstum nach Adaptertherapie bzw. Injektion des Kontrollproteins DE1 detaillierter in Abhängigkeit der Tumorstgröße analysiert. Zu Beginn des Versuchs wurden die Tumorstgrößen zwischen den Gruppen randomisiert, sodass ein vergleichbares Verhältnis kleinerer und größerer Tumore bei Therapiestart vorlag. Im Folgenden wurden die Daten hinsichtlich des Tumorstvolumens neu analysiert und spezifisch Tumore beider Gruppen mit gleicher Größe zum Zeitpunkt der i.v. Injektion vergleichend dargestellt (Abbildung 3.7). Hierbei zeichnet sich eine Korrelation zwischen therapeutischem Erfolg nach Adapterapplikation und der Tumorstgröße zum Behandlungszeitpunkt ab.

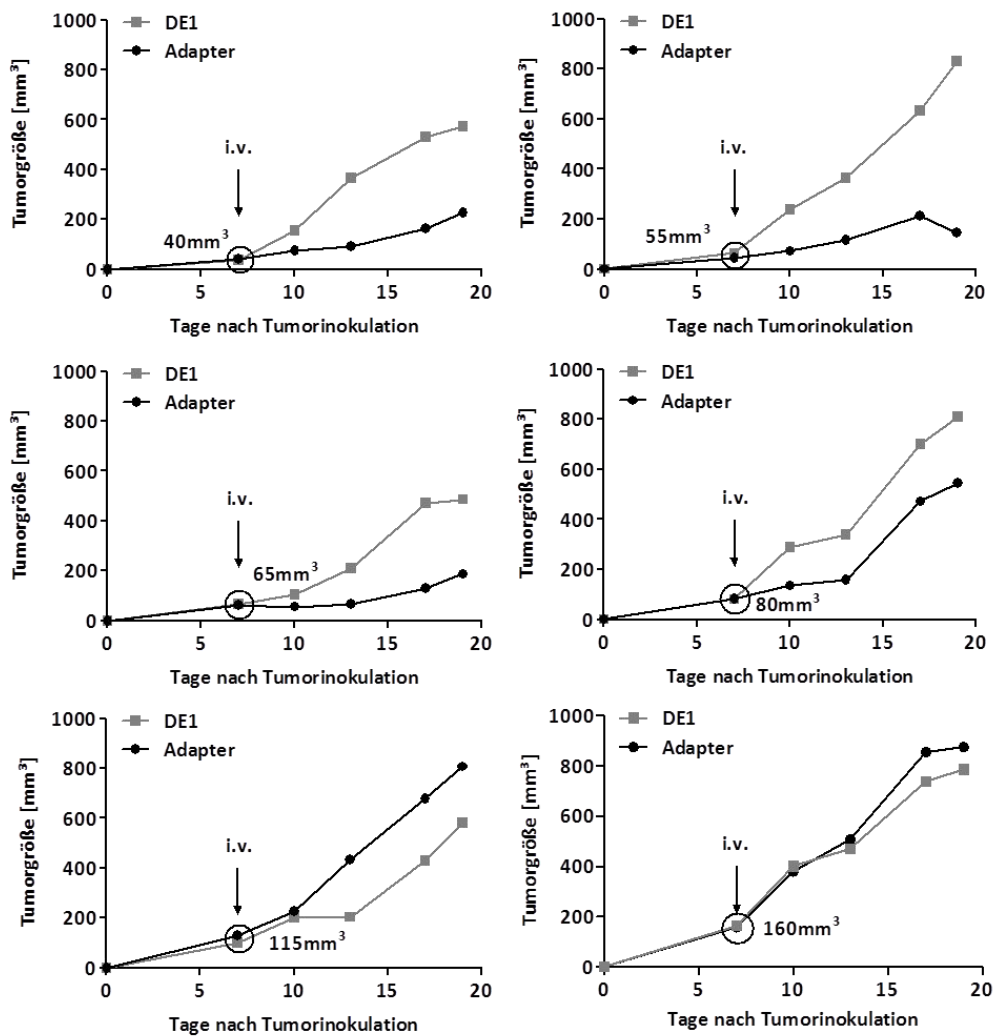


Abbildung 3.7: Eine individuelle Gegenüberstellung von Tumoren gleicher Größe zum Therapiezeitpunkt suggeriert eine Korrelation zwischen dem Therapieerfolg und der Tumorstgröße zum Zeitpunkt der intravenösen Adapterapplikation

Dargestellt sind einzelne Tumorstwachstumskurven beider Gruppen aus dem in Abbildung 3.6 (C) beschriebenen Versuch. Es wurden jeweils Mäuse mit vergleichbarer Tumorstgröße ($\pm 5\text{mm}^3$) mit Adapterprotein oder Kontrollprotein (DE1) i.v. behandelt. Die Wachstumskurven der Tumore beider Gruppen sind vergleichend für jede Größe zum Therapiezeitpunkt dargestellt (40mm^3 - 160mm^3).

Wird die Tumorgöße zum Therapiezeitpunkt berücksichtigt, zeigt sich, dass Tumore mit einer Größe $\leq 80 \text{ mm}^3$ ein sehr gutes Ansprechen auf die Adaptertherapie aufwiesen, währenddessen größere Tumore kaum bzw. gar keine Inhibition des Wachstums zeigten. Die Tumorgöße scheint daher einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie zu haben. Zusammenfassend zeigen diese Daten jedoch, dass sich das Antikörper-*Retargeting* als therapeutische Behandlung von PolySia-positiven Tumoren eignet und eine intravenöse Applikation des Adapters bereits nach einmaliger Gabe zu einer signifikanten Wachstumsinhibition führen kann. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte in allen Folgeversuchen eine intravenöse Applikation des Adapters.

3.2.2 Therapeutische Wirksamkeit in weiteren subkutanen Tumormodellen

Um die in Versuchen mit der Lungenkarzinomzelllinie CMTpSia erhaltenen Daten in weiteren Modellen zu validieren, wurde die therapeutische Wirksamkeit des Adapters in subkutanen Tumormodellen mit zwei weiteren murinen Tumorzelllinien überprüft. Auf ein Ansprechen nach Adaptertherapie wurden dazu die bereits erwähnte Melanomzelllinie B16F10pSia und die Kolonkarzinomzelllinie MC38pSia im Vergleich zu CMTpSia untersucht. In diesem Zusammenhang sollte auch das Überleben mit und ohne Adaptertherapie verglichen werden. Hierzu wurden subkutane Tumore in immunisierten Mäusen etabliert. Adaptertherapie erfolgte an Tag 7 und 14 nach Tumorinokulation. Je Injektion wurden $50 \mu\text{g}$ Adapter appliziert. Das Tumorstadium sowie das Überleben (genaue Abbruchkriterien siehe 5.7.11) wurde dokumentiert (Abbildung 3.8). Der letzte definierte Messpunkt der entsprechenden Tumorstadiumskurven spiegelt dabei den letzten Messzeitpunkt wider, an dem alle Tiere des Versuchs noch lebten.

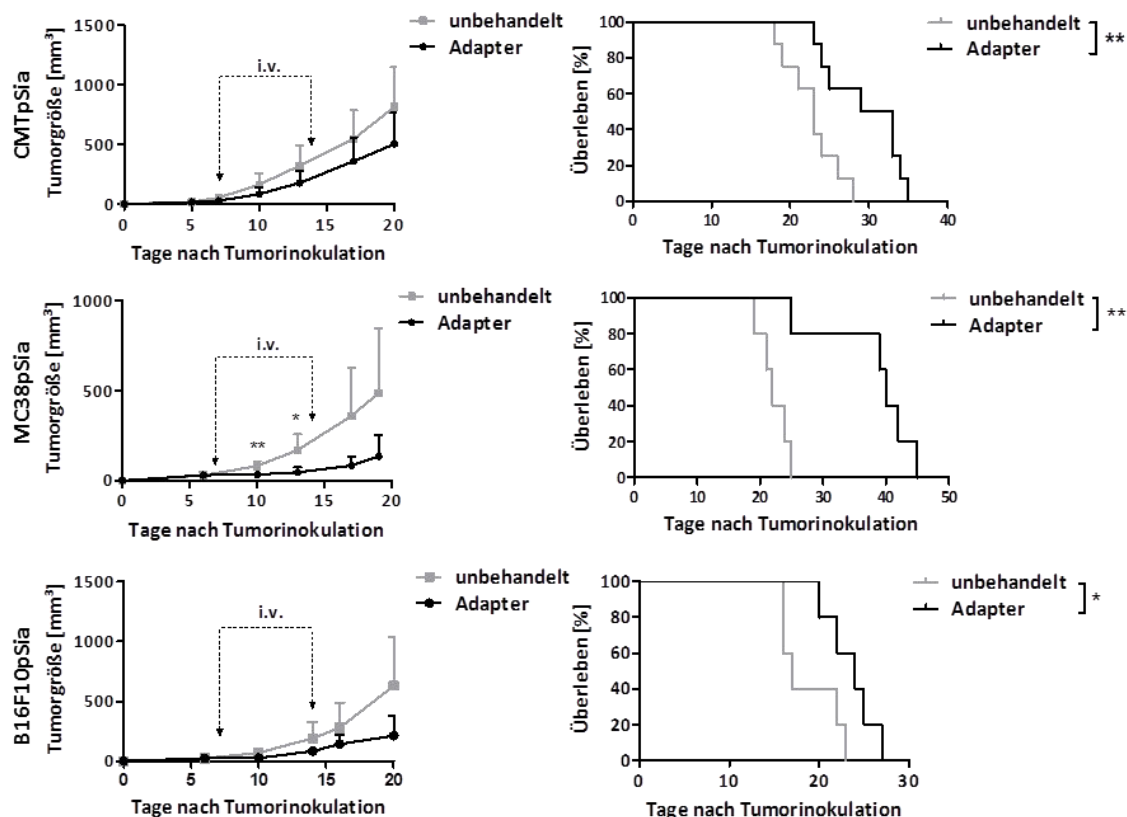


Abbildung 3.8: Intravenöse Adaptertherapie resultiert in einem signifikant verlängerten Überleben in unterschiedlichen subkutanen Tumormodellen

Mäuse wurden wie zuvor beschrieben immunisiert und subkutane Tumore durch Injektion von je $1 \cdot 10^7$ Tumorzellen (CMTpSia (n=8)/MC38pSia (n=5)/B16F10pSia (n=5)) etabliert. An Tag 7 und 14 nach Tumoringokulation erfolgte Adaptertherapie mit je 50 µg aufgereinigtem Adapter (DE1scFvpSia) i.v.. Das Tumorstadium wurde dokumentiert und Tiere nach Erreichen eines der Abbruchkriterien (Details siehe: 5.7.11) getötet. Mittleres Überleben: CMTpSia unbehandelt: 21,5 Tage, Adaptertherapiert: 29 Tage; MC38pSia unbehandelt: 22 Tage, Adaptertherapiert: 40 Tage; B16F10pSia unbehandelt: 17 Tage, Adaptertherapiert: 24 Tage. CMTpSia: n=8; MC38pSia: n=5; B16F10pSia: n=5; *p<0.05; **p<0.01

Alle drei Tumorzelllinien zeigten im subkutanen Tumormodell eine Wachstumsinhibition nach intravenöser Behandlung mit dem Adapterprotein DE1scFvpSia (Abbildung 3.8 links). Dies führte zu einem statistisch signifikant verlängerten Überleben in allen drei Modellen (Abbildung 3.8 rechts). In den CMTpSia- und B16F10pSia-tumortragenden Mäusen resultierte die Adaptertherapie in einer klar erkennbaren Wachstumsverzögerung, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Das Überleben in beiden Modellen wurde in Folge der Therapie allerdings deutlich verlängert. Das mittlere Überleben bei CMT64pSia-tragenden Tieren konnte von unbehandelt 21,5 Tagen auf 29 Tage mit Adapterbehandlung angehoben werden, bei B16F10pSia konnte eine Steigerung von 17 auf 24 Tage erzielt werden. Ein besonders deutliches Ansprechen auf die Adaptertherapie zeigte sich in MC38pSia Tumor-tragenden Mäusen. Die Adaptertherapie resultierte in einer sehr deutlichen und statistisch signifikanten Inhibition des Tumorstadiums (p<0.01 an Tag 10 und p<0.05 an Tag 13). Ein beträchtlich

verlangsamtes Wachstum hielt hierbei deutlich über den Behandlungszeitraum hinaus an. Das mittlere Überleben konnte in Folge dessen eindrucksvoll von unbehandelt 22 Tagen auf 40 Tage mit Adaptertherapie nahezu verdoppelt werden.

Diese Daten zeigen, dass das Adapter-vermittelte *Retargeting* prävalenter humoraler Immunantworten zur Tumorthherapie nach intravenöser Adapterinjektion möglich und effektiv ist.

3.2.3 Therapeutische Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* in größerem Abstand zur Immunisierung

Die bisherigen Daten konnten ein effektives Adapter-vermitteltes Antikörper-*Retargeting* im Rahmen einer wirksamen Tumorthherapie in einem geringen Abstand zur Immunisierung bestätigen. Im Folgenden sollte exemplarisch untersucht werden, ob sich auch humorale Immunantworten lange nach Infektion noch für ein Antikörper-*Retargeting* mit therapeutischer Effizienz eignen. Um dies zu adressieren wurden Tiere immunisiert und erst acht Wochen nach der Virusinfektion subkutane Tumore durch Injektion von MC38pSia Zellen etabliert. Diese wurden im Anschluss wie zuvor durch i.v. Gabe des Adapters (DE1scFvpSia) therapiert und das Tumorwachstum sowie das Überleben dokumentiert (Abbildung 3.9). Der letzte definierte Messpunkt der entsprechenden Wachstumskurven je Gruppe repräsentiert wie zuvor den letzten Messzeitpunkt, an dem alle Tiere der entsprechenden Gruppe noch lebten.

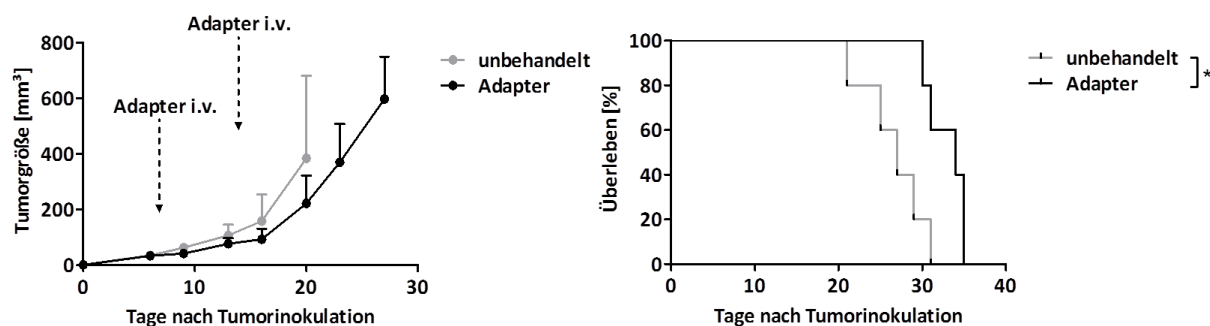


Abbildung 3.9: Bestätigung der therapeutischen Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* in deutlichem Abstand zur Immunisierung

Die Mäuse wurden gegen Adenovirus immunisiert und acht Wochen nach der zweiten Virusinjektion subkutane MC38pSia-Tumore etabliert. An Tag 7 und 14 nach Tumoringokulation wurden die Tiere jeweils mit Adapter i.v. therapiert (je 50 µg DE1scFvpSia) oder unbehandelt belassen (n=5). Das Tumorwachstum und das Überleben wurde dokumentiert (Abbruchkriterien siehe 5.7.11). Mittleres Überleben in Tagen: unbehandelt: 27; Adapter therapiert: 34 *p<0.01

Adapter-behandelte Tiere zeigten in diesem Versuch wie zuvor ein verlangsamtes Tumorwachstum. Dies resultierte in einem signifikant verlängerten Überleben im Vergleich zu Kontrolltieren. Im Vergleich zu der therapeutischen Effizienz der Adapterbehandlung in kurzem Abstand zur Immunisierung (vgl. Abbildung 3.8) ist eine Verringerung der therapeutischen Wirkung zu erkennen, dennoch bestätigen

diese Daten, dass die Adapterbehandlung auch in deutlichem Abstand zur Immunisierung noch anti-tumoral wirksam ist.

3.2.4 Antikörper-Retargeting im orthotopen Tumormodell der Leber

Das hier etablierte Antikörper-Retargeting konnte die therapeutische Wirksamkeit dieser Strategie in verschiedenen subkutanen Tumormodellen bestätigen. Diese Strategie sollte zusätzlich in einem Tumormodell mit größerer Nähe zur klinischen Situation validiert werden. Hierfür wurden orthotope Tumore in der Leber von Ad5-immunisierten p53 fl/fl Mäusen (ermöglicht *in vivo* ein p53 *Knock out* mittels der Cre-Rekombinase) durch *in situ* Elektroporation tumorinduzierender Plasmide etabliert (siehe Material und Methoden 5.7.10; (Gürlevik et al., 2013)). Durch Integration von onkogenem Kras^{G12V} gekoppelt an die Expression der murinen Polysialyltransferase IV (PST IV), konstitutiv aktivem AktI sowie Induktion eines p53 *knock outs* in dem elektroporierten Gewebe erfolgt zunächst die Bildung eines lokal begrenzten PolySia-positiven Primärtumors (siehe Abbildung 3.10), der sich durch ein aggressives und invasives Wachstum auszeichnet. Die Daten zeigen, dass sich durch Elektroporation der oben genannten Plasmide (vgl. DNA-Setup aus Abbildung 3.10 (A) bzw. siehe Details zur Methode unter 5.7.10) in das Lebergewebe ein lokal begrenzter Lebertumor induzieren lässt (Abbildung 3.10 (B)). Nach Etablierung einer Primärzellkultur eines entsprechend induzierten Lebertumors, konnte bestätigt werden, dass die Tumorzellen PolySia-positiv sind und effizient durch das Adapterprotein DE1scFvpSia erkannt werden (Abbildung 3.10 (C)).

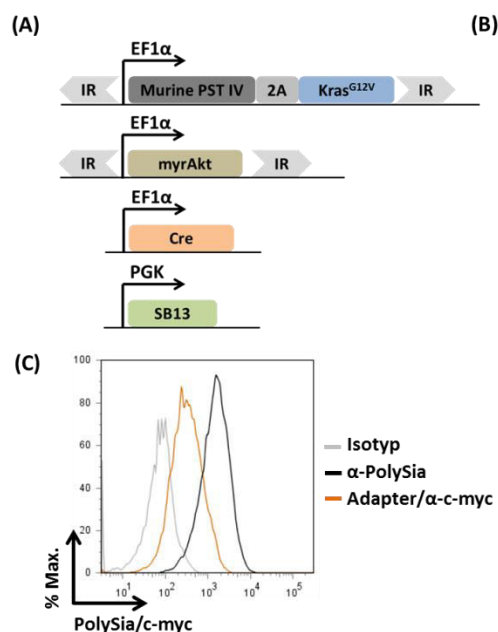


Abbildung 3.10: Orthotopes Tumormodell zur Generierung eines PolySia-positiven Primärtumors in der Leber

(A) Genetisches Setup zur Induktion eines PolySia-positiven Lebertumors durch *in situ* Elektroporation der Plasmide in das Lebergewebe von p53fl/fl Mäusen (Details siehe: 5.7.10). Durch die Expression der SB-Transposase (SB13) erfolgt die stabile Integration der eingebrachten Gene (Kras^{G12V} gekoppelt an die murine PST IV und AktI) in das Genom. Die Expression der Cre-Rekombinase führt zudem zur Induktion eines p53 *knock outs* im elektroporierten Gewebe (B) Drei bis fünf Wochen nach Elektroporation bildet sich zunächst ein lokal begrenzter Tumor in der Leber (C) FACS-Analyse der Tumorzellen isoliert aus einem entsprechend dem genetischen Setup aus (A) induzierten Lebertumor. Analysiert wurde wie zuvor beschrieben der PolySia-Status der Zellen durch die Verwendung eines α -PolySia Antikörpers (735) und die Bindung des Adapters DE1scFvpSia an die Tumorzellen, dessen Bindung im Anschluss über einen sekundären anti-c-myc Antikörper

nachgewiesen wurde (Adapter/ c-myc).

Zur Untersuchung der therapeutischen Effizienz der Adaptertherapie in diesem Tumormodell wurden Lebertumore in Ad5-immunisierten Mäusen etabliert. Die Mäuse wurden wöchentlich palpatorisch auf Tumorformation untersucht und sobald ein positiver Befund (in der Regel bei einer Tumorgöße von 1-3 mm Durchmesser) vorlag mit Adapter (DE1scFvpSia) i.v. therapiert oder unbehandelt belassen. Das Überleben wurde dokumentiert (Abbildung 3.11).

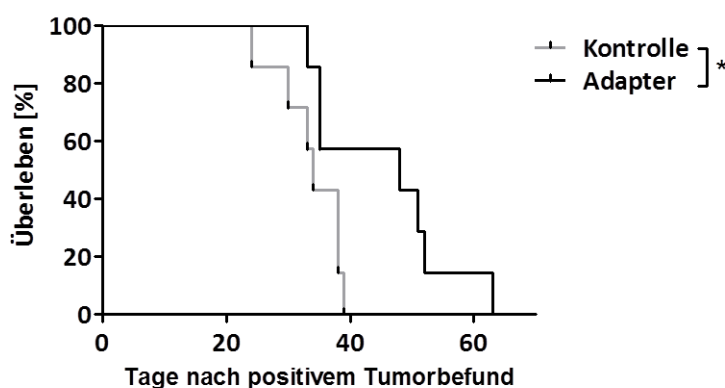


Abbildung 3.11: Adaptertherapie resultiert in einem signifikant verlängerten Überleben in einem aggressiv wachsenden orthotopen Tumormodell der Leber

PolySia-positive orthotope Lebertumore wurden durch *in situ* Elektroporation des Lebergewebes mit Tumor-induzierenden Plasmiden (siehe für Details 5.7.10, Elektroporierte Plasmide siehe Abbildung 3.10 (A)) in Ad5-immunisierten Mäusen etabliert. Nach Entwicklung eines Tumorknotens wurden die Tiere zweimalig im Abstand von einer Woche mit Adapter (50 µg DE1scFvpSia) i.v. behandelt oder

unbehandelt belassen. Das Überleben wurde anhand der definierten Abbruchkriterien bestimmt (siehe 5.7.11). Mittleres Überleben in Tagen: unbehandelt: 34, Adaptertherapiert: 48. n=7; *p<0.01

Die Daten zeigen, dass die Adaptertherapie auch in diesem orthotopen Modell mit aggressivem Tumorwachstum wirksam ist und das Überleben der Individuen signifikant verlängert.

3.2.5 Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Antikörper-*Retargeting*-Strategie auf die alternative Zielstruktur humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA)

Zur Bestätigung des allgemeinen Therapiekonzeptes des Antikörper-*Retargetings* sollte untersucht werden, ob sich der Ansatz auf eine alternative Tumor-selektive Zielstruktur übertragen lässt. Als alternative Zielstruktur wurde das humane Karzinoembryonale Antigen (hCEA) ausgewählt. hCEA ist ein Zelloberflächen-lokalisiertes Glykoprotein mit Zelladhäsions-vermittelnden Eigenschaften (Benchimol et al., 1989). Es wird ähnlich zu PolySia vorwiegend während der embryonalen Entwicklung gebildet, während es im adulten Stadium nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Erneute CEA-Reexpression erfolgt jedoch auf verschiedenen malignen Tumoren mit besonders hoher Inzidenz bei Tumoren gastrointestinalen Ursprungs (Blumenthal et al., 2007). Es bildet somit eine weitere Tumor-selektive Zielstruktur, die gezielte Tumorthapien ermöglicht. Zunächst erfolgte die Konstruktion eines bispezifischen Adaptermoleküls analog zu dem etablierten Adapter DE1scFvpSia. Als Tumor-spezifischer Ligand wurde hierbei ein scFv-Fragment gegen humanes CEA aus dem mAb BW431/26 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hinrich Abken) gerichtet verwendet (siehe Abbildung 3.12 (A)). Die Bindung der DE1-Domäne im Kontext des neuen Adapters DE1scFvhCEA durch anti-adenovirale Antikörper wurde wie zuvor beschrieben (vgl. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2) *in vitro* mittels ELISA-

Analyse verifiziert (Abbildung 3.12 (B)). Um auch hier im Anschluss die Wirksamkeit des Adapters im murinen Tumormodell untersuchen zu können, wurde die Expression von hCEA durch retrovirale Transduktion der murinen Kolonkarzinomzellen MC38 realisiert. Die Verwendung von murinem CEA war hier aufgrund der humanen Spezifität des anti-CEA scFvs nicht möglich. Der hCEA-Status der generierten MC38hCEA Zellen und die Erkennung der Zellen durch das Adaptermolekül DE1scFvhCEA wurde mittels FACS Analyse überprüft (Abbildung 3.12 (C)).

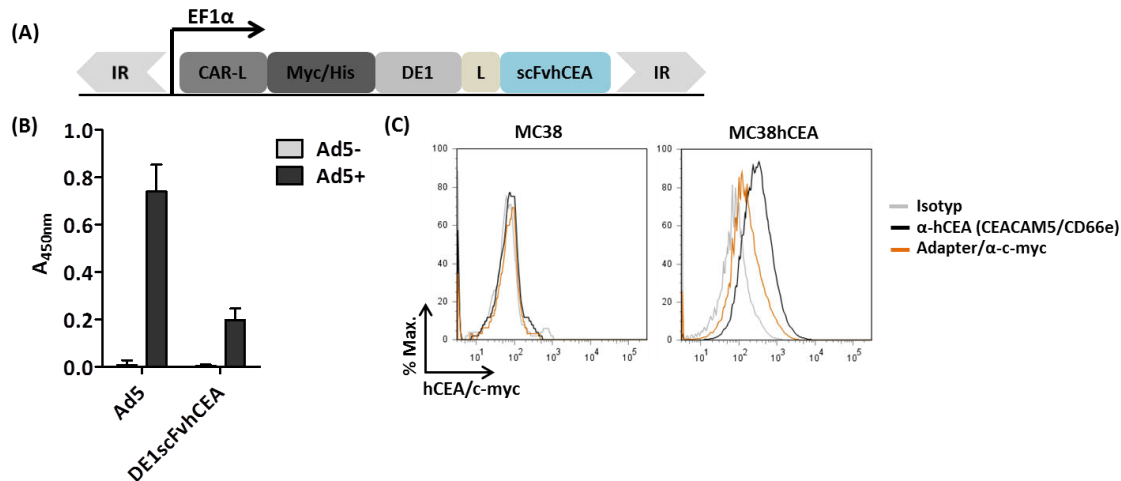


Abbildung 3.12: Bestätigung des Adapterkonzepts durch Generierung eines Adapters gegen eine alternative Zielstruktur

(A) Die Konstruktion eines Adapterproteins zum *Retargeting* DE1-gebundener Antikörper auf die Tumor-assoziierte Zielstruktur humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA) erfolgte analog zu dem Adapter DE1scFvpSia unter Verwendung eines scFv gegen hCEA als Tumor-spezifischer Ligand des Adapters (vgl. Abbildung 2.2) **(B)** ELISA-Analyse zur Bindung des aufgereinigten Adapters DE1scFvhCEA durch anti-adenovirale IgGs. ELISA-Platten wurden mit Ad5 bzw. Adapter (DE1scFvhCEA) beschichtet und im Anschluss mit Serum naiver (Ad5-, n=2) oder Ad5-immunisierter Mäuse (Ad5+, n=5) inkubiert. Die Bindung von Maus-IgGs wurde durch einen sekundären anti-Maus-IgG quantifiziert. **(C)** FACS-Analyse zur Bindung des Adapterproteins an die stabil hCEA-exprimierenden Zellen MC38hCEA bzw. die hCEA-negativen MC38. Die Zellen wurden mit aufgereinigtem Adapterprotein und anschließend einem α -c-myc Antikörper zur Detektion des Adapters auf der Zelloberfläche (DE1scFvhCEA/ α -myc) oder mit einem Kontrollantikörper gegen hCEA (α -hCEA (CEACAM5/CD66e)) und jeweils einem sekundärem PE-gekoppelten Antikörper inkubiert.

Die ELISA-Daten (Abbildung 3.12 (B)) zeigen, dass die DE1 Domäne auch im Rahmen des Adapterproteins DE1scFvhCEA mit der alternativen Tumor-selektiven Domäne gegen hCEA verlässlich von einer substantiellen Menge anti-adenoviraler IgG-Antikörper im Serum Ad5-immunisierter Mäuse gebunden wird (vgl. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2). Es erfolgte auch hier keine Erkennung durch IgGs im Serum naiver Tiere. Mittels FACS-Analyse konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass die generierten MC38hCEA-Zellen eine Expression des humanen CEA aufweisen (Abbildung 3.12 (C)). Zudem zeigte sich, dass die Zellen spezifisch von dem Adapterprotein gebunden werden, währenddessen hCEA-negative (nicht transduzierte) Zellen (MC38) nicht erkannt werden. Die Affinität der Bindung erwies sich jedoch im Vergleich zum Kontrollantikörper schwächer ausgeprägt.

Nachdem *in vitro* die Funktionalität beider Domänen des Adapters DE1scFvhCEA bestätigt werden konnten, sollte die therapeutische Wirkung auf hCEA-positive Tumoren *in vivo* im murinen Tumormodell

validiert werden. Hierzu wurden MC38hCEA-Zellen zur Etablierung subkutaner Tumore in immunisierten Mäusen verwendet und die Tiere im Anschluss mit dem Adapter DE1scFvhCEA i.v. therapiert oder unbehandelt belassen (siehe Abbildung 3.13).

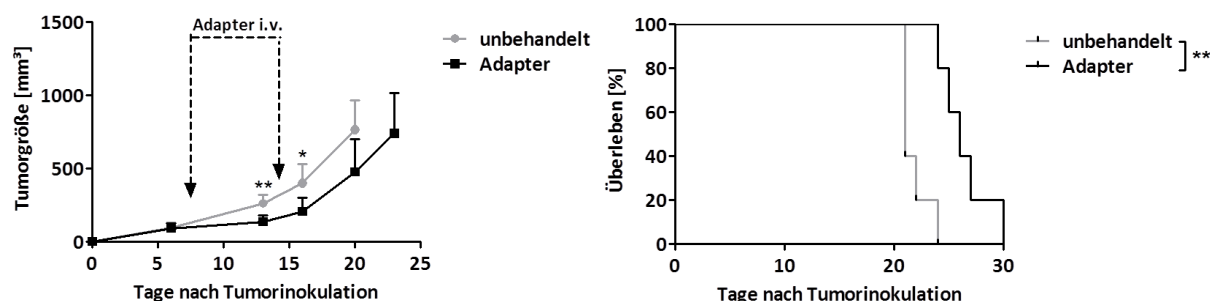


Abbildung 3.13: Adaptertherapie im Kontext der alternativen Zielstruktur hCEA inhibiert wirksam das Tumorstadium

hCEA-positive Tumore wurden durch s.c. Injektion von MC38hCEA-Zellen in Ad5-immunisierten Mäusen etabliert. Die Tiere wurden im Anschluss zweimal i.v. mit jeweils 50 µg Adapter (DE1scFvhCEA) therapiert (Tag 7 & 14) oder unbehandelt belassen. Das Tumorwachstum wurde dokumentiert und Tiere nach Erreichen eines der Abbruchkriterien (siehe 5.7.11) getötet. n=5; *p<0.05; **p<0.01

Die Dokumentation des Tumorwachstums offenbarte eine leichte, nach Therapiestart zunächst auch signifikante, Wachstumsinhibition in den therapierten Mäusen verglichen zu unbehandelten Kontrollen. Dies führte zu einer signifikanten Steigerung des mittleren Überlebens um 5 Tage (26 Tage im Vergleich zu 21 Tagen in der Kontrollgruppe).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das in der Arbeit entwickelte Therapiekonzept zur Nutzung anti-viraler Antikörper für die Therapie solider Tumore effektiv und auf verschiedene Zielstrukturen übertragbar ist. In allen weiteren Versuchen wurde jedoch stellvertretend das Adapter-vermittelte Antikörper-*Retargeting* auf PolySia als Zielstruktur unter Einsatz des Adapters DE1scFvpSia untersucht.

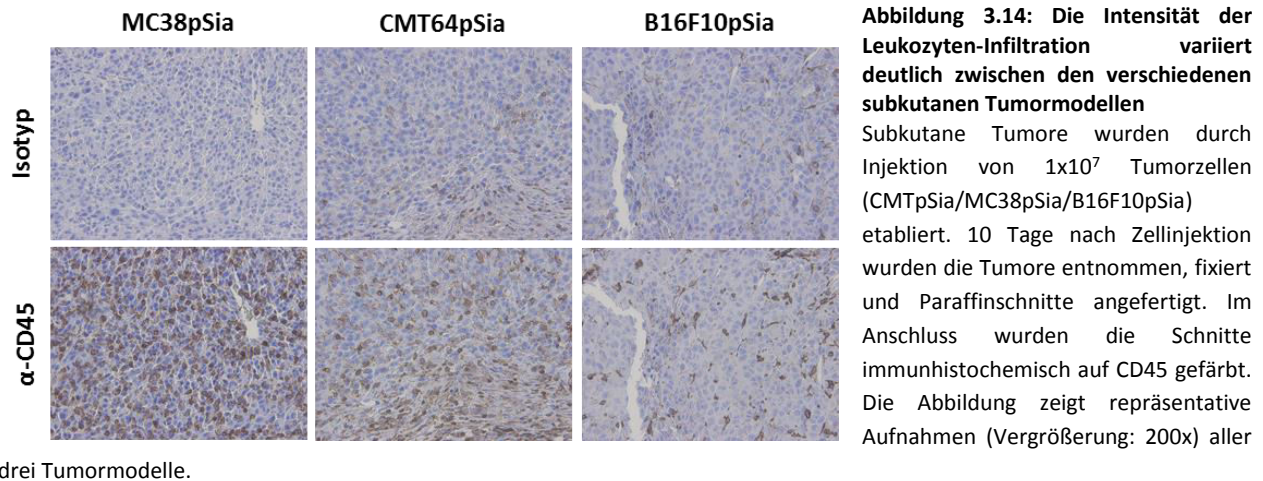
3.3 Untersuchungen zu den zugrundeliegenden Wirkmechanismen der Adaptertherapie

Die Wirksamkeit des Adapter-vermittelten *Retargetings* viraler Antikörper in der Tumorthherapie konnte durch die bisherigen Versuche eindeutig gezeigt werden. Um erste Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Adaptertherapie bzw. die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen zu erhalten, wurden im Folgenden die tumorinfiltrierenden Immunzellen nach Adapterapplikation untersucht.

3.3.1 Charakterisierung der tumorinfiltrierenden Immunzellen in Folge der Adaptertherapie

Um diejenigen Immunzellen identifizieren zu können, die verantwortlich für den Adapter-basierten Therapieeffekt sind, wurden die tumorinfiltrierenden Immunzellen nach Adaptergabe untersucht. Um ein gut geeignetes Modell für die Immunzellanalysen zu bestimmen, wurden zunächst unbehandelte subkutane Tumore der drei Zelllinien MC38pSia, CMT64pSia und B16F10pSia 10 Tage nach

Tumorzellinjektion entnommen und immunhistochemisch auf CD45-positive Leukozyten gefärbt (Abbildung 3.14).



Die immunhistochemische Analyse zeigt, dass MC38pSia-Tumore am stärksten leukozytär infiltriert sind. Zur Analyse verschiedener Immunzellpopulationen mit ausreichender statistischer Relevanz, insbesondere auch in kleinen Tumorknoten, ist ein hoher Infiltrationsgrad von Vorteil. Aus diesem Grund und um die nötigen Tierzahlen gering zu halten, wurden die weiteren Untersuchungen folglich in den stark infiltrierten MC38pSia-Tumoren durchgeführt. Subkutane Tumore wurden wie zuvor beschrieben durch Injektion von MC38pSia Zellen in Ad5-immunisierten Individuen etabliert und nachfolgend zweimalig mit Adapter therapiert oder unbehandelt belassen (vgl. Abbildung 3.8). Um die Infiltration von Immunzellen an verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Adaptertherapie zu untersuchen, wurde ein Teil der Tumore zu einem frühen Zeitpunkt und ein anderer Teil zu einem späteren Zeitpunkt während der Therapie zur Analyse entnommen. Entnommenes Tumorgewebe wurde im Anschluss zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet und die tumorinfiltrierenden Immunzellen im Vergleich zu Proben aus unbehandelten Kontrollen mittels Durchflusszytometrie identifiziert und quantifiziert (Versuchsschema und Analysezeitpunkte siehe Abbildung 3.15).

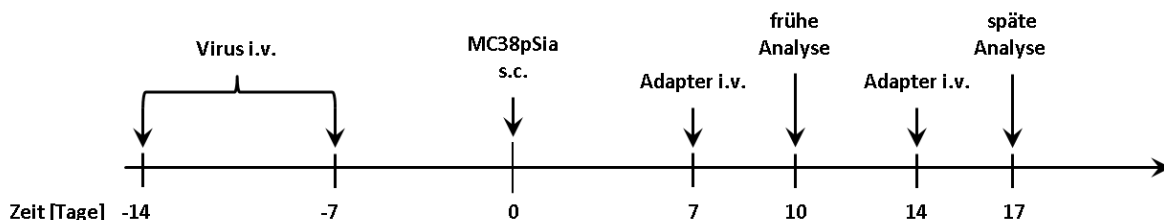


Abbildung 3.15: Schematischer Versuchsablauf zur Untersuchung tumorinfiltrierender Immunzellen nach Adaptertherapie
 Mäuse wurden gegen Ad5 immunisiert und sieben Tage nach der zweiten Virusinjektion subkutane MC38pSia-Tumore etabliert. Adaptertherapie erfolgte 7 und 14 Tage nach Zellinjektion i.v. mit je $50 \mu\text{g}$ DE1scFvpSia. Drei Tage nach der ersten (frühe Analyse) bzw. zweiten (späte Analyse) Adaptergabe wurden Tumore entnommen und auf tumorinfiltrierende Immunzellen untersucht.

Tumorinfiltrierende Leukozyten wurden mittels eines α -CD45.2 Antikörpers und Lymphozyten mittels eines α -CD90.2 Antikörpers identifiziert und vorsortiert. Innerhalb der Leukozyten wurden zur Bestimmung verschiedener NK-Zell-Populationen die Expression der Oberflächenmarker NK1.1, CD49a und CD49b auf den Zellen durch entsprechende Antikörper quantifiziert (Abbildung 3.16/Abbildung 3.19). NK-Zellen sind in der Lage, direkt Tumorzellen zu zerstören und können unter anderem durch Antikörper gegen Tumorzellen aktiviert werden (Lanier et al., 1988; Morel et al., 1999). Über eine Koexpression von NK1.1 und CD49b(DX5) lassen sich gereifte, zirkulierende bzw. migrierende NK-Zellen, sogenannte konventionale NK-Zellen identifizieren. Im Gegensatz dazu spiegeln NK1.1CD49a-doppelt positive Zellen residente bzw. gewebsspezifische NK-Zellen wider (Erick and Brossay, 2016). Zur Charakterisierung von myeloiden Suppressorzellen und Makrophagen wurde innerhalb der Leukozyten die Expression der Oberflächenmarker CD11b, Gr1 und F4/80 untersucht (Abbildung 3.17/Abbildung 3.20). CD11b ist ein allgemeiner Marker für myeloide Zellen. Myeloide Suppressorzellen (MDSCs) können eine Aktivierung von anti-tumoralen Immunreaktion inhibieren und werden mit einer Tumor-fördernden Funktion assoziiert (Nagaraj and Gabrilovich, 2008). MDSCs können über eine hohe Expression von CD11b und eine in ihrer Stärke variierende Expression des Granulozytenmarkers Gr1 ($\text{Gr1}^{\text{low}} - \text{Gr1}^{\text{high}}$) identifiziert werden (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Reife Makrophagen hingegen zeichnen sich durch eine intermediäre Expression von Gr1 und eine starke Expression von F4/80 aus ($\text{Gr1}^{\text{int}}\text{F4/80}^{\text{high}}$). Zudem sind sie als Zellen des myeloiden Kompartiments allgemein CD11b positiv. Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, Antikörper-opsonisierte Tumorzellen über Phagozytose zu eliminieren (Gül et al., 2014). Neben den Leukozyten wurden innerhalb der Lymphozytenpopulation im Tumor die Anteile an CD4 und CD8 T-Zellen bestimmt (Abbildung 3.18/Abbildung 3.21). CD8-positive zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, effizient maligne Zellen zu erkennen und zu zerstören. Eine hohe CD8-Frequenz im Tumorgewebe korreliert daher oft mit einer positiven Prognose (Fridman et al., 2012). Parallel dazu gilt auch eine Verschiebung des CD8/CD4 Verhältnisses als positiver prognostischer Faktor und als Anzeichen für therapeutisches Ansprechen (Hernberg et al., 1996; Huang et al., 2015).

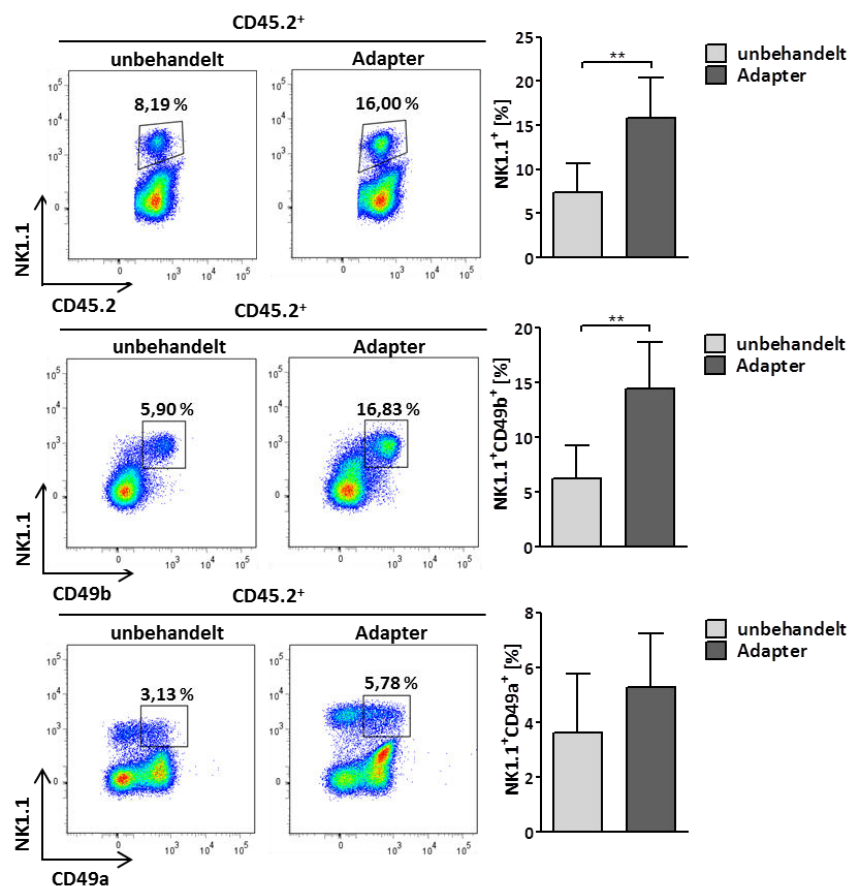


Abbildung 3.16: NK-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe während der frühen Phase der Adaptertherapie

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Drei Tage nach der ersten Adaptergabe (frühe Analyse) wurden mittels Durchflusszytometrie die tumorinfiltrierenden NK-Zellen identifiziert und quantifiziert. Dargestellt sind die Anteile an NK1.1⁺ Zellen, sowie NK1.1⁺CD49b⁺ (konventionelle NK-Zellen) und NK1.1⁺CD49a⁺ (residente NK-Zellen) Zellen innerhalb der CD45.2⁺ Leukozytenpopulation. n=5; *p<0,05; ** p<0,01

Die FACS-Analyse der tumorinfiltrierenden NK-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt während der Adaptertherapie (drei Tage nach der ersten Adapterapplikation) zeigt eine deutlich erhöhte Anzahl an NK1.1-positiven Zellen mit einem Anteil von ca. 16 % der Leukozyten (CD45.2⁺) in den Proben aus therapierten Mäusen verglichen mit nur 7 % in den Proben unbehandelter Tiere (Abbildung 3.16 oben). Bei einer genaueren Analyse dieser Zellpopulation durch Auftrennung in konventionelle (NK1.1⁺CD49b⁺) und residente NK-Zellen (NK1.1⁺CD49a⁺) wird ein starker Anstieg der konventionellen NK-Zellen in Folge der Therapie apparent. Der starke Anstieg der NK1.1-positiven Zellen scheint daher durch eine Einwanderung bzw. Expansion an konventionellen NK-Zellen zu entstehen (Abbildung 3.16 Mitte). Im Vergleich dazu war zum gleichen Zeitpunkt nur eine tendenziell erhöhte Menge an gewebsspezifischen NK-Zellen zu beobachten. Der Anstieg erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 3.16 unten).

Die Analyse der myeloiden Zellen zeigte hingegen wenig Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrolltumoren und Adapter therapierten Tumoren (Abbildung 3.17).

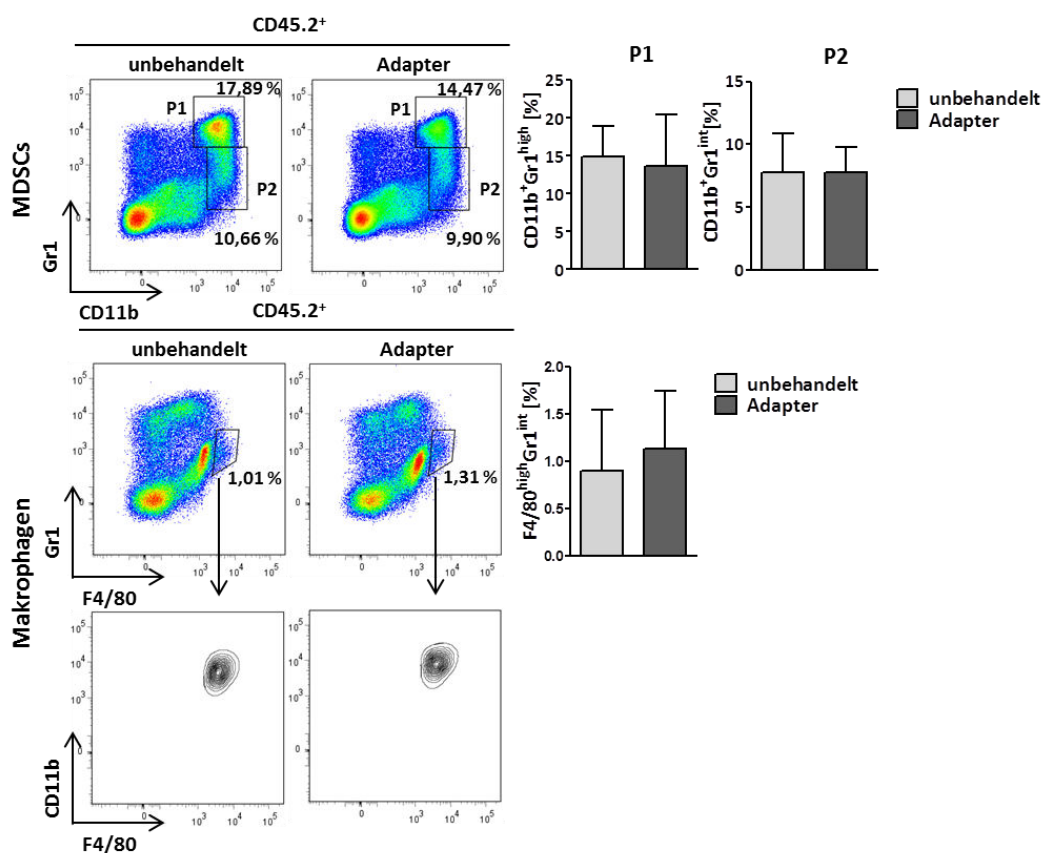


Abbildung 3.17: Die Frequenzen an tumorinfiltrierenden MDSCs und Makrophagen sind zum frühen Zeitpunkt der Adaptertherapie unverändert

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Zum frühen Analysezeitpunkt (drei Tage nach der ersten Adaptergabe) wurden die tumorinfiltrierenden myeloiden Zellen quantifiziert. Nach Selektion der CD45.2⁺ Leukozyten wurden die Anteile an MDSCs (oben) in Form der Subpopulationen P1 (CD11b^{high}Gr1^{high}) und P2 (CD11b^{high}Gr1^{int}) und die Anteile an gereiften Makrophagen (Gr1^{int}F4/80^{high}) (Mitte) bestimmt. Die Expression von CD11b durch die identifizierten Makrophagen wurde anschließend überprüft (unten). n=5

Die Daten zeigen keine wesentlichen Veränderungen der Anteile an tumorinfiltrierenden MDSCs drei Tage nach initialer Adaptertherapie. Bei der Analyse der Makrophagen wurde die Population auf die CD11b-positiven Zellen eingegrenzt. Die Expression von CD11b durch die identifizierten Makrophagen ist an dieser Stelle exemplarisch darunter dargestellt und wurde auch bei allen weiteren Untersuchungen bei der Identifikation der Makrophagenpopulation überprüft. Die Quantifizierung zeigt eine leicht erhöhte Frequenz an Makrophagen innerhalb der Tumorseiten Adapter-therapierter Individuen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Zuwachs war jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Quantifizierung der CD4-positiven sowie CD8-positiven T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulationen der Tumore zeigt zu diesem frühen Zeitpunkt während der Therapie ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.18).

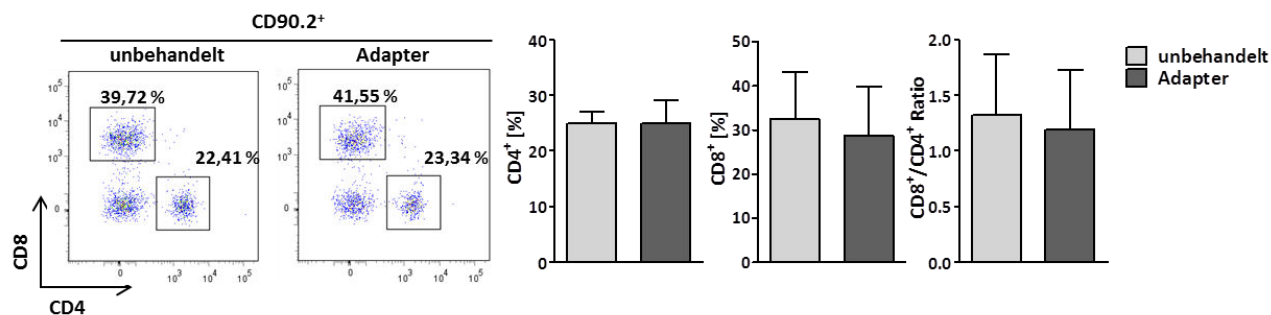


Abbildung 3.18: Das Verhältnis tumorinfiltrierender CD4 und CD8 T-Zellen ist in der initialen Therapiephase unverändert

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Drei Tage nach der ersten Adaptergabe (Analyse I) wurden die tumorinfiltrierenden T-Zellen innerhalb der CD90.2 positiven T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Quantifiziert wurden die Anteile an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD90.2⁺, daraus wurde danach das individuelle Verhältnis (je Tumor) von CD8 zu CD4 T-Zellen bestimmt. n=5

Auch die Bildung des individuellen CD8⁺/CD4⁺-Verhältnisses (CD8⁺/CD4⁺ Ratio) konnte keine offensichtlichen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt während der Therapie aufzeigen.

Zusammenfassend konnte innerhalb der untersuchten tumorinfiltrierenden Leukozyten und Lymphozyten ein sehr deutlicher Anstieg der konventionellen NK-Zellen im Tumorgewebe zu diesem frühen Zeitpunkt nach Therapieinitialisierung (drei Tage nach der ersten Adaptergabe) gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass NK-Zellen möglicherweise an der initialen Wirkung des Adapters beteiligt sind. Da die Anteile weiterer untersuchter Immunzellen zum gleichen Zeitpunkt unverändert blieben, lässt sich keine Aussage über die Beteiligung anderer Immunzelltypen während dieser initialen Phase der Therapie treffen.

Um Ansatzpunkte zu finden, welche Immunzellen während der weiterführenden Adaptertherapie eine Rolle spielen, erfolgte eine zweite Analyse der tumorinfiltrierenden Zellen zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Abbildung 3.15). Hier wurden erneut die infiltrierenden NK-Zellen, MDSCs, Makrophagen und CD4 bzw. CD8 T-Zellen untersucht. Die Quantifizierung der NK-Zellen zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt während der Therapie zeigt im Vergleich zum frühen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen der therapierten Gruppe und unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3.19). Dies ist sowohl hinsichtlich des Gesamtanteils NK1.1-positiver Zellen als auch im Hinblick auf die Anteile an konventionellen (NK1.1⁺CD49b⁺) und residenten (NK1.1⁺CD49a⁺) NK-Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten zu beobachten.

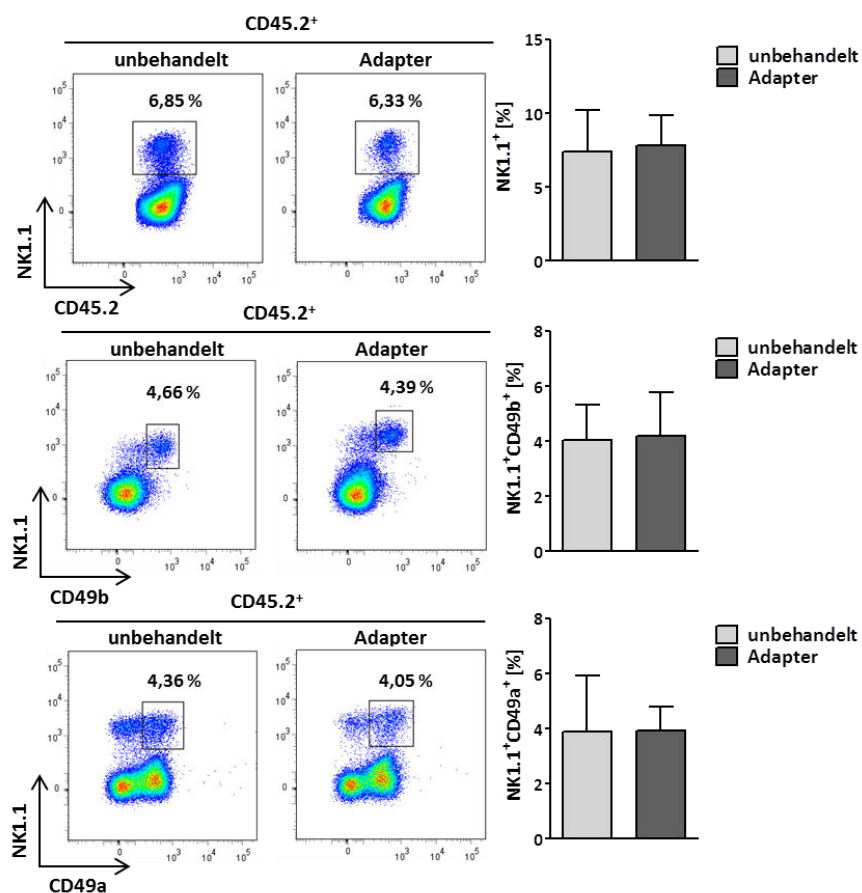


Abbildung 3.19:
Tumorinfiltrierende NK-Zellpopulationen sind zum späten Zeitpunkt nach Therapiebeginn nicht verändert

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Drei Tage nach der zweiten Adaptergabe wurden die tumorinfiltrierenden Leukozyten über die Expression von CD45.2 identifiziert und innerhalb dieser Population die Anteile an NK1.1⁺ Zellen, sowie NK1.1⁺CD49b⁺ (konventionelle NK-Zellen) und NK1.1⁺CD49a⁺ (residente NK-Zellen) Zellen bestimmt. n=6

Bei der Analyse der MDSCs und Makrophagen hingegen konnten zum gleichen Zeitpunkt deutlich veränderte Anteile innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten festgestellt werden (Abbildung 3.20). Ein interessanter Aspekt zeigte sich bei der Quantifizierung der MDSCs. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich verschiedene MDSC-Subpopulationen in ihrer immunsuppressiven Potenz deutlich unterscheiden. So weisen insbesondere Subpopulationen mit geringer und intermediärer Gr1-Expression einen immunsuppressiven Phänotyp auf, während Zellen mit einer hohen Gr1-Expression diese Eigenschaft nur sehr bedingt aufweisen (Dolcetti et al., 2010). Bei der hier durchgeführten Analyse der MDSCs konnte eine klare Reduktion der als besonders immunsuppressiv beschriebenen MDSC-Anteile P2 (CD11b⁺Gr1^{int}) in Folge der Adaptertherapie nachgewiesen werden (Abbildung 3.20 oben). Zum anderen zeigte die Analyse eine sehr markante Abnahme der Makrophagen (Gr1^{int}F4/80^{high}) innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 3.20 unten).

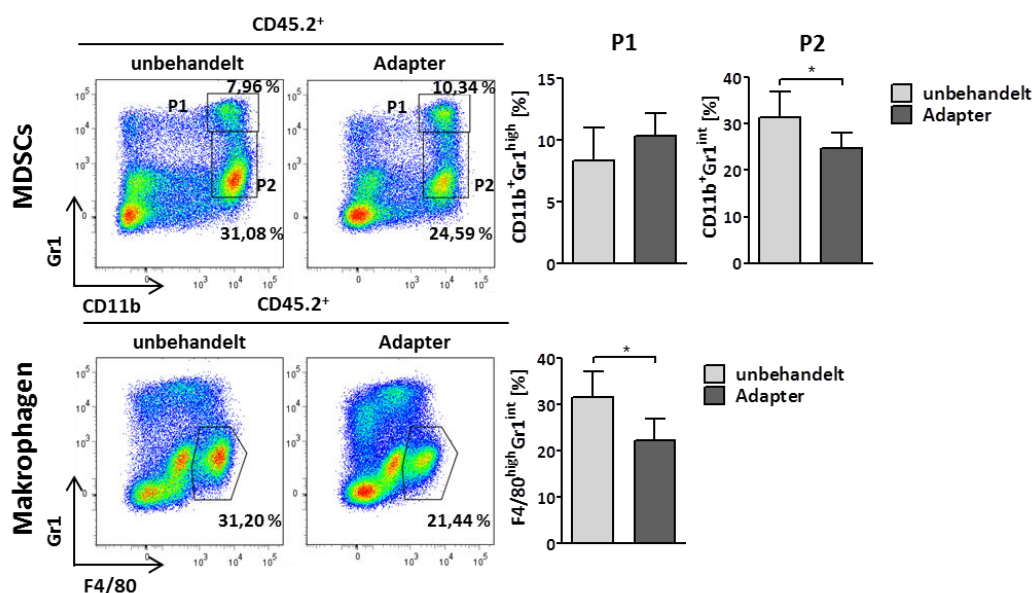


Abbildung 3.20: Anteile an tumorinfiltrierenden Makrophagen und immunsuppressive MSCDs sind zum späten Zeitpunkt nach Adaptertherapie erniedrigt

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Drei Tage nach der zweiten Adaptergabe wurden die MDSCs (Gr1⁺CD11b⁺) mit den einzelnen Subpopulationen P1 (CD11b^{high}Gr1^{high}) und P2 (CD11b^{high}Gr1^{int}) und die Anteile an gereiften Makrophagen (Gr1^{int}F4/80^{high}) innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten (CD45.2⁺) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. n=6; * p<0.05

Des Weiteren zeigten sich zu diesem späten Zeitpunkt während der Therapie signifikante Veränderungen innerhalb der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (Abbildung 3.21).

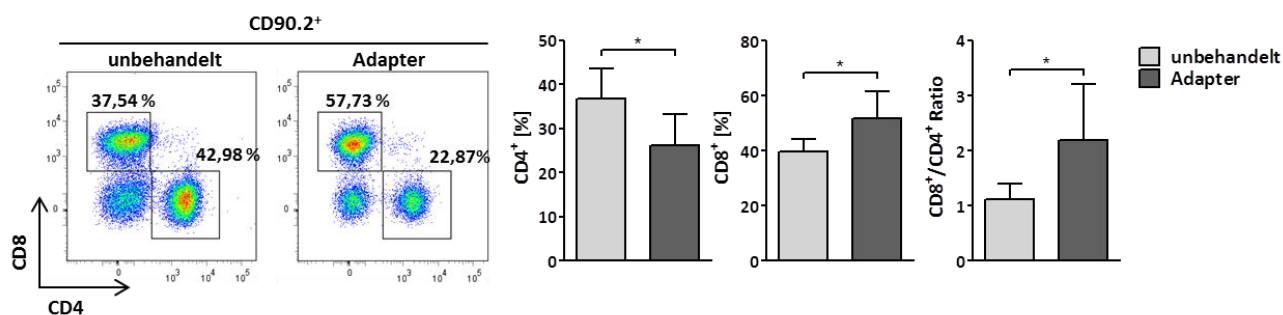


Abbildung 3.21: Zum späten Zeitpunkt während der Adaptertherapie verschiebt sich das Verhältnis von CD8⁺/CD4⁺ T-Lymphozyten zu Gunsten von CD8⁺T-Zellen

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt. Drei Tage nach der zweiten Adaptergabe wurden die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (CD90.2⁺) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden die Anteile an CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation quantifiziert und ihr individuelles Verhältnis (CD8⁺/CD4⁺) bestimmt. n=6; *p<0.05

Bei der Quantifizierung der Anteile an CD4-positiven sowie CD8-positiven Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte eine eindeutige Verschiebung zu Gunsten der CD8 T-Zellen beobachtet werden. Es ließen sich wesentlich höhere Anteile an CD8 T-Zellen und ein verringerter Anteil an CD4 T-Zellen im Tumorgewebe therapierter Individuen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachweisen. Dabei lag der Anteil an CD8-positiven Zellen nach Therapie bei durchschnittlich 51,7 % im Gegensatz zu 39,7 % im Tumorgewebe un behandelter Tiere. Die Menge an CD4-positiven Zellen sank

dabei von unbehandelt 36,8 % auf 26,1 % nach Therapie ab. Dies resultierte in einer deutlich erhöhten CD8⁺/CD4⁺-Ratio in Tumoren therapiert Individuen im Vergleich zur Kontrollgruppe (CD8⁺/CD4⁺-Ratio behandelt: 2,2; unbehandelt: 1,1).

Zusammenfassend tritt somit in Folge der Adaptertherapie zu einem späten Zeitpunkt eine deutliche Verschiebung des CD8⁺/CD4⁺-Verhältnisses zu Gunsten von CD8 T-Zellen ein. Zudem kommt es zum gleichen Zeitpunkt zu einer Reduktion an immunsuppressiven MDSCs im Tumorgewebe sowie zu einer Abnahme an gereiften Makrophagen.

3.3.2 Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten nach Adaptertherapie

Die Induktion robuster T-Zell-Antworten gegen Tumor-assoziierte Antigene ist essentiell für eine effektive anti-tumorale Immunantwort. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die Adaptertherapie in der Lage ist, systemische Tumorantigen-spezifische CD8 T-Zellantworten zu induzieren. Zur Adressierung dieser Fragestellung wurde zum späten Zeitpunkt der Therapie (vgl. Abbildung 3.15) neben dem Tumorgewebe auch die Milz der Tiere entnommen und die Splenozyten isoliert. Diese wurden im Anschluss auf die Stimulierbarkeit mit einem Tumor-spezifischen Peptid untersucht. Exemplarisch wurde hierfür das MC38-Neoantigen Adpgk verwendet. Adpgk ist ein mutiertes Tumorantigen das einen Aminosäureaustausch (ASMTN**M**ELM, Wildtyppeptid: ASMTN**R**ELM) im Vergleich zum Wildtyppeptid aufweist (Yadav et al., 2014). Zur Analyse Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen innerhalb der isolierten Splenozyten, wurden die Splenozyten über Nacht mit dem Adpgk-Peptid oder einem irrelevanten Kontrollpeptid stimuliert und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie die Menge Interferon gamma (IFN γ) produzierender CD8 T-Zellen quantifiziert (Abbildung 3.22).

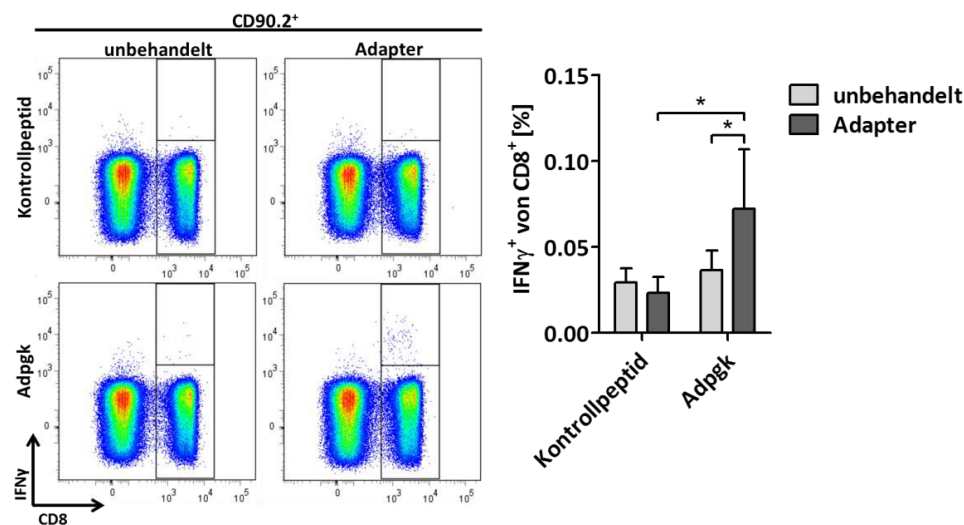


Abbildung 3.22: Adaptertherapie unterstützt die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantwort

Der Versuch wurde wie beschrieben durchgeführt (Abbildung 3.15). Zum späten Zeitpunkt während der Adaptertherapie wurden die Splenozyten isoliert und über Nacht mit dem mutierten MC38-Antigen Adpgk oder einem irrelevanten Kontrollpeptid inkubiert

(Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit dem viralen Peptid DBP43, hier nicht dargestellt). Die Sekretion von IFN γ aus den Zellen wurde durch Zugabe von Brefeldin A unterbunden und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie die CD90.2⁺CD8⁺ Zellen identifiziert und innerhalb dieser Population die Anteile IFN γ -positiven Zellen bestimmt. n=8; *p<0.01

Die Quantifizierung ergab einen signifikant erhöhten Anteil an IFN γ -positiven CD8 T-Zellen nach Stimulation mit Adpgk in den Splenozyten von Adapter-therapierten Individuen im Vergleich zur Stimulation mit dem Kontrollpeptid. In unbehandelten Tieren war kein Unterschied in der Menge an IFN γ -produzierenden CD8 Zellen nach Inkubation mit dem Kontrollpeptid im Vergleich zu Adpgk zu erkennen. Dies zeigt eindeutig, hier exemplarisch anhand der Adpgk-spezifische T-Zellantwort dargestellt, dass das Adapter-vermittelte Antikörper-*Retargeting* eine systemische Induktion von Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellen fördert.

3.3.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Immunzelltypen *in vivo*

Die Untersuchungen der tumorinfiltrierenden Immunzellen aus isoliertem Tumorgewebe während der Adaptertherapie lassen die Beteiligung von NK-Zellen und CD8 T-Zellen an der Adapter-vermittelten anti-tumoralen Wirkung vermuten. Um einen eindeutigen mechanistischen Nachweis für die Beteiligung dieser Immunzellpopulation *in vivo* zu erbringen, wurden Depletionsversuche während der Adaptertherapie durchgeführt. Hierzu wurden analog zu den bisherigen Experimenten Mäuse gegen Ad5 immunisiert, subkutane MC38pSia-Tumore etabliert und zweimalig mit Adapter therapiert (Tag 7 und 14 nach Tumorinokulation). Beginnend zwei Tage vor Therapiestart (Tag fünf nach Tumorinokulation), wurden verschiedenen Immunzellpopulationen einzeln oder in Kombination durch Applikation von depletierenden Antikörpern bzw. Liposomen depletiert. Es erfolgte im Rahmen dieser Versuche eine Depletion von NK-Zellen (Abbildung 3.23 (A)), CD8-Zellen (Abbildung 3.23 (B)), NK- und CD8-Zellen (Abbildung 3.23 (C)) und Makrophagen (Abbildung 3.23 (D)). Das Tumorwachstum sowie das Überleben wurde im Anschluss vergleichend zu Adapter-therapierten Individuen ohne Depletion und unbehandelten Kontrollen dokumentiert (Abbildung 3.23; Abbruchkriterien siehe 5.7.11).

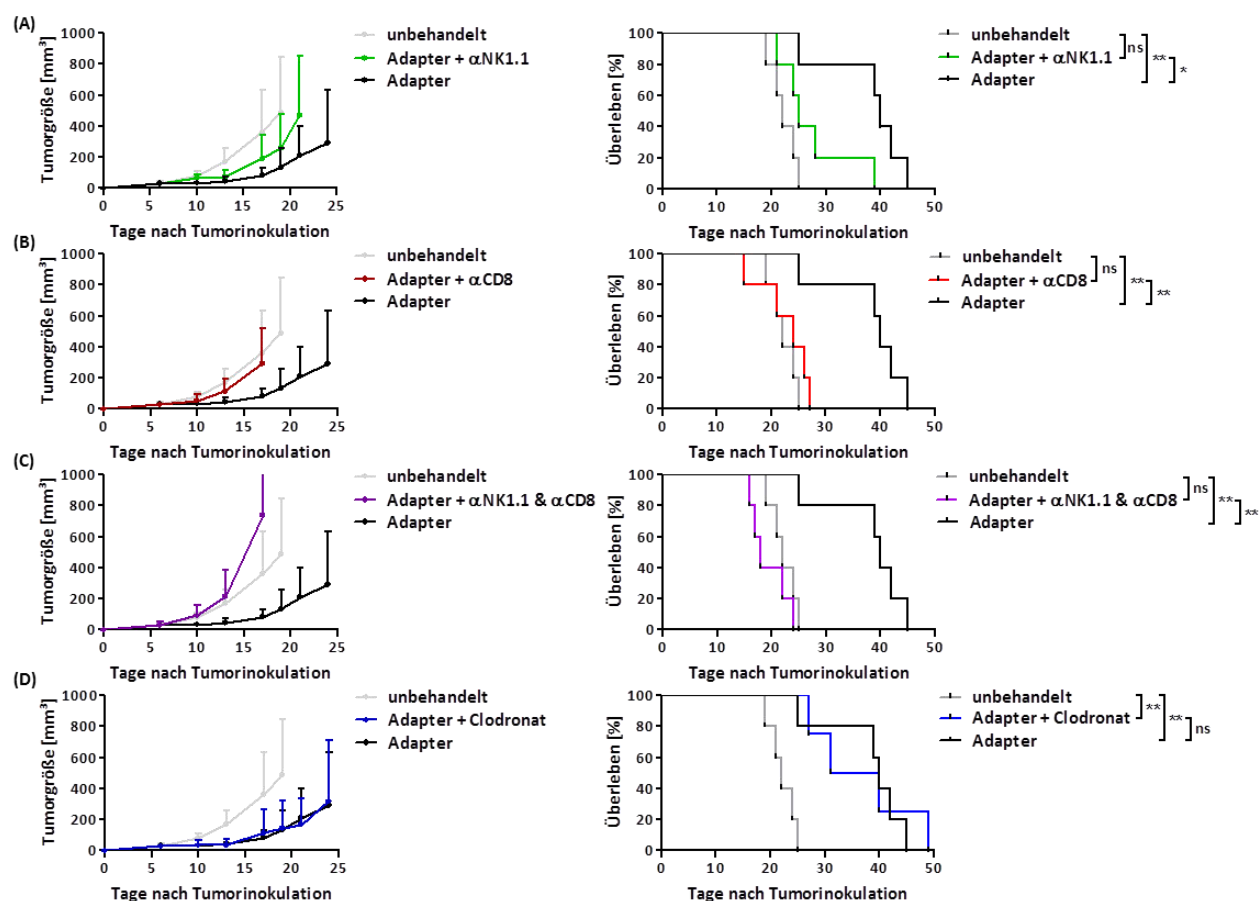


Abbildung 3.23: Depletionsversuche *in vivo* bestätigen die Beteiligung von NK- und CD8-Zellen am anti-tumoralen Effekt der Adaptertherapie

Mäuse wurden immunisiert und subkutane Tumore durch Injektion von MC38pSia Zellen wie zuvor beschrieben etabliert. Adaptertherapie erfolgte an Tag 7 und 14 nach Tumorinokulation (i.v. mit jeweils 50 µg DE1scFvpSia). Immunzelldepletion erfolgte beginnend zwei Tage vor Therapiebeginn durch i.p. Injektionen depletierender Antikörper oder Liposomen. Dargestellt sind Tumorwachstum und Überleben Adapter behandelter Tiere (n=5) sowie unbehandelter Kontrollen (n=5) im Vergleich zu Tieren mit Adaptertherapie unter (A) Depletion von NK-Zellen (n=5) durch einen depletierenden αNK1.1. Antikörper, (B) Depletion von CD8 T-Zellen (n=5) durch den Einsatz eines depletierenden Antikörpers gegen CD8, (C) Ko-Depletion von CD8- und NK-Zellen (n=5) durch den Einsatz depletierender Antikörper gegen NK1.1 und CD8, (D) Depletion von Makrophagen (n=4) durch Injektion von Clodronat-Liposomen. Jeweils links: Entwicklung des Tumorwachstums, rechts: Überleben; mittleres Überleben in Tagen: unbehandelt: 22; Adapter: 40; Adapter + αNK1.1: 25; Adapter + αCD8: 24; Adapter + αNK1.1 & αCD8: 18; Adapter + Clodronat: 35.5. *p<0.05; **p<0.01

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Depletion von Makrophagen zu keinem nennenswerten Verlust des therapeutischen Effekts der Adaptertherapie führt (Abbildung 3.23 (D)). Es konnten weder Veränderungen hinsichtlich des Tumorwachstum noch des Überlebens im Vergleich zur Therapie ohne Depletion festgestellt werden. Eine Depletion von NK-Zellen während der Adaptertherapie hingegen resultierte in einem deutlich schnelleren Tumorwachstum verglichen mit Tieren ohne Depletion (Abbildung 3.23 (A) links). Die Tumorstadiumsrate erreichte jedoch nicht die Geschwindigkeit der Tumore der untherapierten Kontrolltiere. In Korrelation dazu ließ sich mittels Adaptertherapie in Abwesenheit von NK-Zellen das mittlere Überleben der Versuchstiere nur noch tendenziell auf 25 Tage

verlängern, jedoch nicht signifikant im Vergleich zu 22 Tagen in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies unterstützt die Hypothese, dass NK-Zellen eine entscheidende Rolle beim therapeutischen Erfolg der Adapterbehandlung spielen. Die Depletion von CD8-Zellen während der Therapie zeigte ebenfalls deutliche Auswirkungen auf die Effektivität der Adapter-vermittelten anti-tumoralen Wirkung (Abbildung 3.23 (B)). Hier konnte durch die Depletion während der Adaptertherapie kein Unterschied im Tumorwachstum im Vergleich zu unbehandelten Tieren mehr festgestellt werden. Auch das Überleben war unter Depletion nur noch minimal verbessert (24 Tage) verglichen zu Kontrolltieren (22 Tage). Die Kodepletion beider Immunzellpopulationen während der Therapie führte sogar zu einem schnelleren Wachstum der Tumore und einem verkürzten mittleren Überleben von 18 Tagen verglichen zu untherapierten Tieren. Aufgrund dieser Ergebnisse ist zusätzlich zur Adapter-induzierten anti-tumoralen Wirkung dieser Zelltypen eine geringe natürliche Kontrolle des Tumorwachstums durch NK-Zellen und CD8-Zellen denkbar, die in Folge der Kodepletion aufgehoben wird. Die Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass sowohl CD8 als auch NK-Zellen entscheidend an der Adapter-vermittelten anti-tumoralen Wirkung beteiligt sind. Da sowohl die Monodepletion von CD8-Zellen als auch NK-Zellen bereits zu einem nahezu vollständigen Verlust der Adapter-vermittelten Tumorwachstumshemmung führt, wäre es denkbar, dass ein mechanistischer Zusammenhang besteht. Diesbezüglich ist bekannt, dass NK-Zellen entscheidend an der Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort beteiligt sein können (Adam et al., 2005; Kos and Engleman, 1996) und eine Depletion von NK-Zellen während einer Tumorummuntherapie die Entstehung Tumorantigen-spezifischer CD8-Zellen maßgeblich hemmen kann (Liu et al., 2008). Um eine entsprechende Rolle der NK-Zellen im Rahmen der Adaptertherapie zu untersuchen, wurde die Auswirkung einer NK-Zelldepletion während der Therapie auf die Entstehung einer Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantwort analysiert. Hierzu wurden wie zuvor beschrieben die Splenozyten zum späten Zeitpunkt nach Therapieinitiation aufgereinigt und auf Adpgk-spezifische CD8 T-Zellen untersucht. Vergleichend quantifiziert wurden hierbei die T-Zellantworten unbehandelter Individuen, sowie Adapter-therapierter Tiere mit und ohne NK-Zelldepletion (Abbildung 3.24).

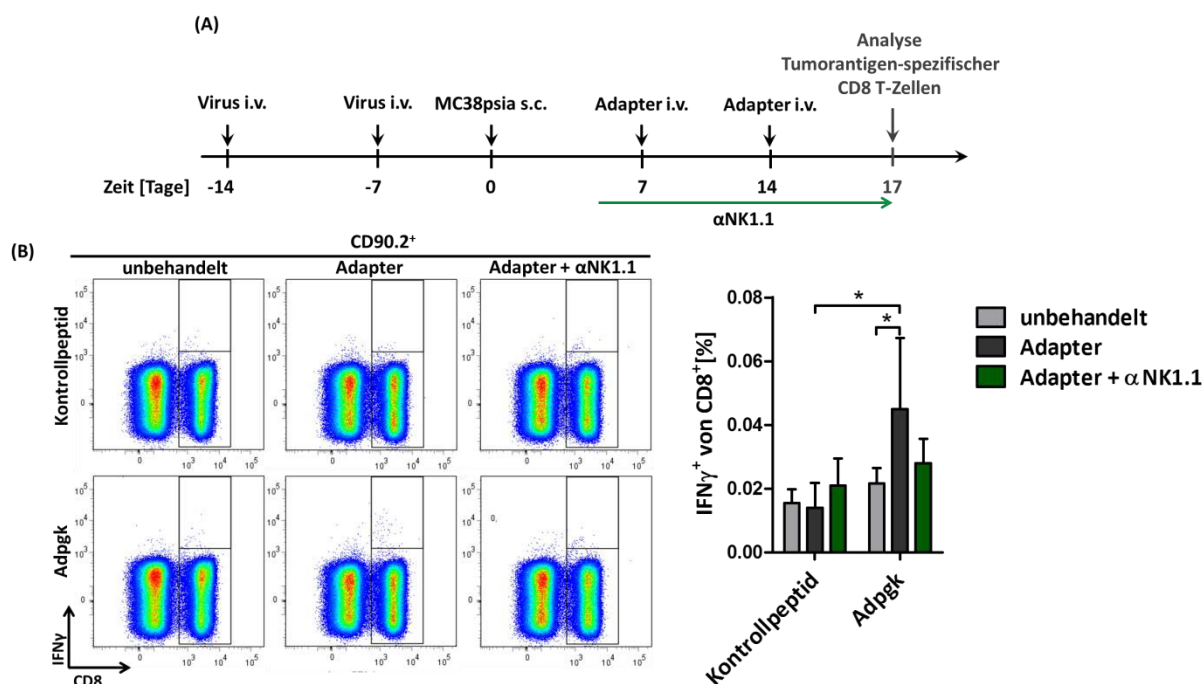


Abbildung 3.24: Die Depletion von NK-Zellen während der Adaptertherapie verhindert die Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten

(A) Der Versuch erfolgte wie zuvor in Abbildung 3.23 beschrieben. Immunisierte MC38pSia Tumor-tragende Mäuse wurden mit Adapter behandelt (50 μ g DE1scFvpSia) oder unbehandelt belassen. Ein Teil der Adapter-therapierten Individuen erhielt eine α NK1.1 Antikörper beginnend zwei Tage vor Therapiebeginn zur Depletion von NK-Zellen. (B) Zum späten Zeitpunkt während der Therapie (vgl. Abbildung 3.15) wurden die Splenozyten der Mäuse isoliert und über Nacht mit dem mutierten MC38-Antigen Adpgk oder einem irrelevanten Kontrollpeptid inkubiert (bzw. als positiv Kontrolle mit dem viralen Peptid DBP43, hier nicht dargestellt). Die Sekretion von IFN γ aus den Zellen wurde durch Zugabe von Brefeldin A verhindert und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie die CD90.2⁺CD8⁺ Zellen identifiziert und innerhalb dieser Population die Anteile IFN γ -positiver Zellen bestimmt. * $p < 0.01$; $n = 5$

Die Daten zeigen eindeutig, dass eine Depletion von NK-Zellen während der Adaptertherapie die Entstehung Tumorantigen-spezifischer (Adpgk-spezifischer) CD8 T-Zellen maßgeblich reduziert. Wird die Frequenz IFN γ -produzierender CD8-Zellen in Folge der Stimulation mit dem Tumor-spezifischen Antigen Adpgk im Vergleich zur Stimulation mit einem irrelevanten Kontrollpeptid verglichen, zeigt sich kaum ein Unterschied. Die Werte sind diesbezüglich vergleichbar mit den Werten der unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse weisen auf eine NK-Zell-abhängige Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen nach Adaptertherapie hin und bestätigen einen mechanistischen Zusammenhang.

3.3.4 Bestätigung der tumorinfiltrierenden Zellen nach Adaptertherapie im CMTpSia-Tumormodell

Zur Validierung der Beteiligung sowohl von NK-Zellen als auch CD8-Zellen an dem Adapter-vermittelten anti-tumoralen Effekt *in vivo* in einem zweiten Tumormodell wurden die im MC38pSia-Modell erhaltenen Daten zur Immunzellinfiltration mit Ergebnissen aus CMTpSia-tumortragenden Tieren

verglichen. Hier erfolgte zur Bestätigung erneut die Analyse der tumorinfiltrierenden NK-Zellen sowie CD8 und CD4 T-Zellpopulationen zu einem frühen sowie einem späten Zeitpunkt während der Adaptertherapie mittels Durchflusszytometrie. Der Versuchsablauf erfolgte analog zu den Versuchen im MC38pSia Modell, die Mäuse erhielten lediglich CMTpSia-Zellen zur Etablierung subkutaner Tumore (Abbildung 3.25 (A)).

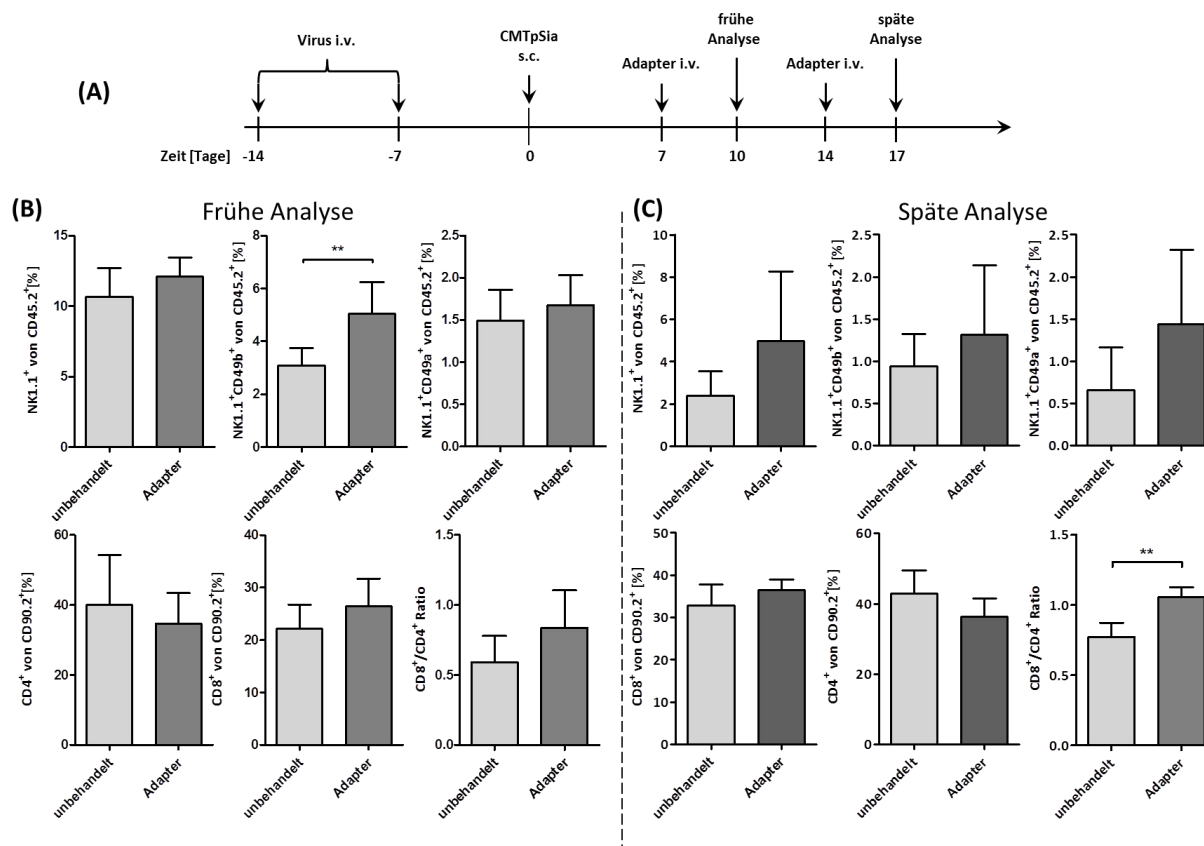


Abbildung 3.25: Tumorinfiltrierende Immunzellen in subkutanen CMTpSia-Tumoren nach Adaptertherapie bestätigen die Ergebnisse aus MC38pSia-Tumoren

(A) Mäuse wurden mit Ad5 gegen Adenovirus immunisiert und subkutane Tumore durch Injektion von 1×10^7 CMTpSia-Zellen etabliert. Adaptertherapie erfolgte an Tag 7 und 14 nach Tumorzellinokulation. Jeweils drei Tage nach Adaptertherapie (Tag 10 und 17) wurden Tumore entnommen, die Zellen aufbereitet und infiltrierende Immunzellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert und quantifiziert. **(B)** frühe Analyse – drei Tage nach der ersten Adaptergabe wurden die NK1.1 positiven sowie NK1.1⁺CD49b⁺ und NK1.1⁺CD49a⁺ positiven Zellen innerhalb der CD45.2 positiven Zellpopulation sowie die Anteile und Verhältnisse von CD8 und CD4 T-Zellen innerhalb der CD90.2 positiven Zellen bestimmt **(C)** späte Analyse – drei Tage nach der zweiten Adaptergabe wurden erneut wie unter **(B)** beschrieben die NK- und T-Zellanteile quantifiziert. ** $p < 0.01$ n=6

Die Analyse der infiltrierenden NK- und CD8 bzw. CD4 T-Zellen in CMTpSia-Tumoren bestätigt die zuvor in MC38-Tumoren gemachten Beobachtungen. Zu einem frühen Zeitpunkt nach der Therapieinitialisierung ist hierbei eine Einwanderung an konventionellen (NK1.1⁺CD49b⁺) NK-Zellen zu sehen, während die Anteile an CD8 und CD4 T-Zellen nicht signifikant verändert sind. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz zu Gunsten der CD8 T-Zellpopulation. Diese Tendenz wird erst zu einem späteren Zeitpunkt signifikant. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass NK-Zellen und CD8 T-Zellen eine Rolle

in der Vermittlung des tumorinhibitorischen Effekts des Adapter-basierten Antikörper-*Retargetings* spielen.

3.4 Therapeutische Wirksamkeit im metastasierenden Modell

Die bisher erhaltenen Daten zur Wirkung des Adapter-vermittelten Antikörper *Retargetings* konnten unter anderem zeigen, dass insbesondere die therapeutische Wirkung auf kleine Tumorknoten hoch effektiv ist (vgl. Abbildung 3.7). Aufgrund dieser Beobachtung und der gezeigten Adapter-induzierten Triggerung systemischer Tumor-gerichteter CD8 T-Zellantworten (vgl. Abbildung 3.22) nach intravenöser Applikation sollte die Wirksamkeit der Adaptertherapie auf Metastasen adressiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden in Ad5-immunisierten Mäusen Lungenmetastasen durch intravenöse Injektion von CMTpSia-Zellen etabliert und diese im Anschluss mit Adapter i.v. zu einem frühen oder etwas späteren Zeitpunkt behandelt. An Tag 11 nach Zellinjektion wurden das Lungengewebe präpariert und histologisch auf Metastasen untersucht (Abbildung 3.26).

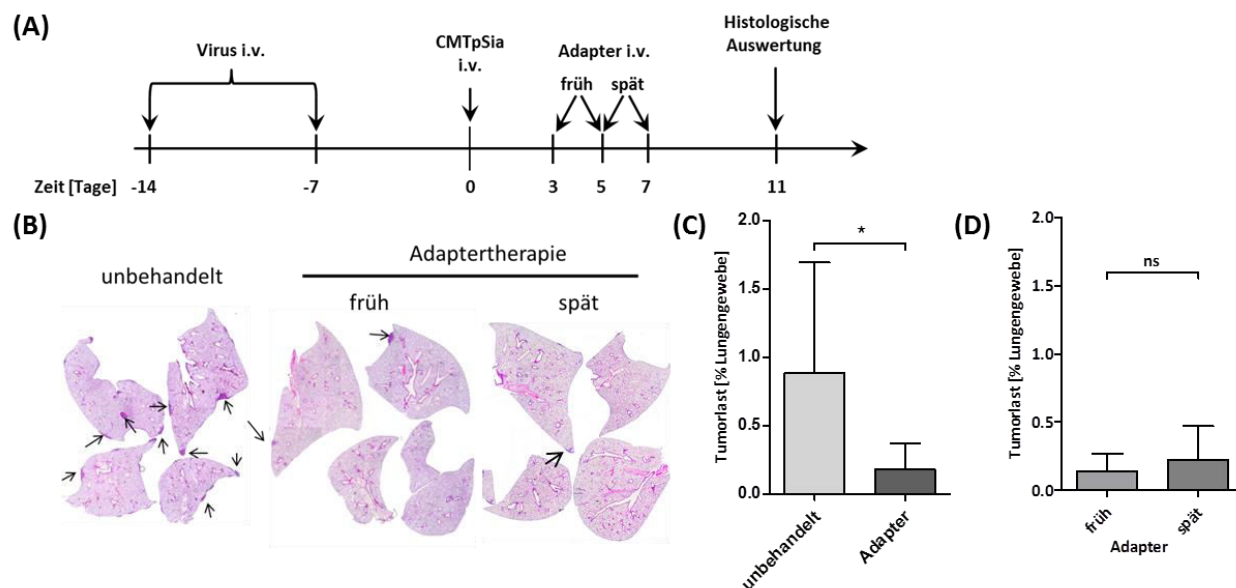


Abbildung 3.26: Adaptertherapie führt zu einer effektiven Reduktion von CMTpSia-Lungenmetastasen

(A) Mäuse wurden gegen Ad5 immunisiert und Lungenmetastasen durch i.v. Injektion von 3×10^5 CMTpSia Zellen etabliert, diese wurden früh (Tag 3 & 5 (n=4)) bzw. spät (Tag 5 & 7 (n=4)) i.v. mit Adapter (je 50 μ g DE1scFvpSia) behandelt oder unbehandelt (n=4) belassen. 11 Tage nach Zellinjektion wurden die Tiere getötet, Lungen entnommen und histologisch auf Metastasen untersucht. **(B)** Repräsentative Hämalaun/Eosin (H/E)-gefärbte Paraffinschnitte der Lunge unbehandelter, sowie früh bzw. spät Adapter-therapierter Tiere (Vergrößerung: 20x). **(C)** Quantifizierung der Tumoralast in der Lunge als prozentualer Anteil am Gesamtlungengewebe. **(D)** Vergleich der Tumoralast in den Lungen früh und spät therapiert Individuen. *p<0,05.

Die Quantifizierung der Tumoralast in der Lunge zeigt einen signifikant geringeren Anteil an Tumorgewebe in den Adapter-behandelten Tieren mit durchschnittlich ca. 0,2% im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, die einen Anteil von ca. 0,9% aufwiesen. Zwischen den früh und spät therapierten Mäusen war hierbei kein Unterschied in der Tumoralast bei Versuchsende festzustellen (Abbildung 3.26(D)). Da alle Versuchstiere, auch in der Kontrollgruppe, noch relativ geringe Tumoranteile in der Lunge aufwiesen,

erfolgte in einem zweiten Versuch die Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt. Hierbei sollten die Ergebnisse bestätigt und anhand eines späteren Auswertungszeitpunktes verdeutlicht werden. Da zuvor kein Unterschied im Therapieerfolg bei früher und später Adaptergabe zu beobachten war und die wiederholte Adaptergabe auch hier gut vertragen wurde, erhielten die Tiere in diesem Versuch 3 Adapterinjektionen (Tag drei, fünf und sieben nach Tumorzellinjektion). Da 17 Tage nach Tumorzellinjektion bei den ersten Individuen der Kontrollgruppe eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens festzustellen war (genaue Abbruchkriterien siehe 5.7.11), wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt terminiert. Die Lungen wurden entnommen und histologisch auf Tumorgewebe in der Lunge untersucht (Abbildung 3.27).

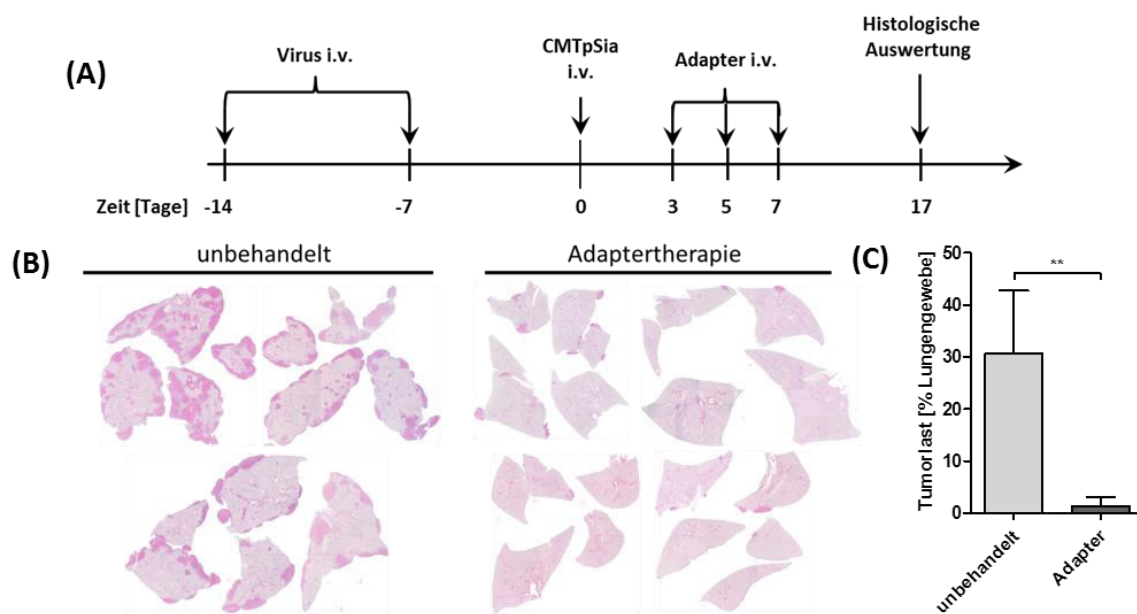


Abbildung 3.27: Bestätigung der therapeutischen Wirkung des Adapters auf CMTpSia-Lungenmetastasen

(A) Mäuse wurden gegen Ad5 immunisiert und Lungenmetastasen durch i.v. Applikation von CMTpSia-Zellen etabliert. Tiere wurden an Tag drei, fünf und sieben i.v. mit Adapter therapiert (je 50 µg DE1scFvpSia) oder unbehandelt belassen (n=5). An Tag 17 nach Tumorzellinjektion wurde der Versuch terminiert, die Lungen entnommen und histologisch auf Tumorgewebe in der Lunge untersucht. **(B)** Repräsentative H/E-gefärbte Paraffinschnitte der Lunge beider Gruppen (Vergrößerung 20x). **(C)** Quantifizierung der Tumoralast in der Lunge.

Die Quantifizierung der Tumoralast in der Lunge zeigte eine sehr deutliche Reduktion der Tumoranteile am Lungengewebe der therapierten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die Tumoralast konnte dabei von durchschnittlich 34 % in der Kontrolle auf unter 2 % nach Adaptertherapie reduziert werden (Abbildung 3.27(C)). Diese Daten zeigen, dass das Adapter-vermittelte *Retargeting* anti-viraler Antikörper nicht nur einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt auf den Primärtumor hat, sondern auch sehr effektiv auf Metastasen wirkt.

3.5 Untersuchungen zur Sequenztherapie von onkolytischer Virotherapie und Antikörper-Retargeting

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das *Retargeting* prävalenter humoraler Immunantworten gegen Adenovirus eine effektive Strategie zur Tumorimmuntherapie darstellt. Eine andere effektive Variante der Immuntherapie von Tumoren stellt der Einsatz onkolytischer Viren dar. In Folge der Virotherapie kommt es neben der Induktion von anti-tumoralen Immunreaktion auch zur Triggerung starker anti-viraler Immunantworten. Insbesondere in Folge der Therapie mit onkolytischen Adenoviren werden starke humorale Immunantworten induziert. Aufgrund dieser Tatsache sollte die Wirksamkeit einer Sequenztherapie aus initialer Virotherapie gefolgt von Adapter-vermitteltem *Retargeting* induzierter anti-viraler Antikörper adressiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden subkutane MC38pSia-Tumore in naiven Mäusen etabliert und im Anschluss mit dem onkolytischen Adenovirus Serotyp 5 hTertAd (Wirth et al., 2003) i.t. behandelt (Tag sechs nach Tumordinokulation). Zum *Retargeting* getriggelter anti-adenoviraler Antikörper gegen die Tumorzellen erfolgte an Tag fünf nach Virotherapie die Applikation des Adapters i.v. (Abbildung 3.28 (A)). Das Tumorstadium sowie das Überleben wurden dokumentiert (Abbildung 3.28(B) & (C)).

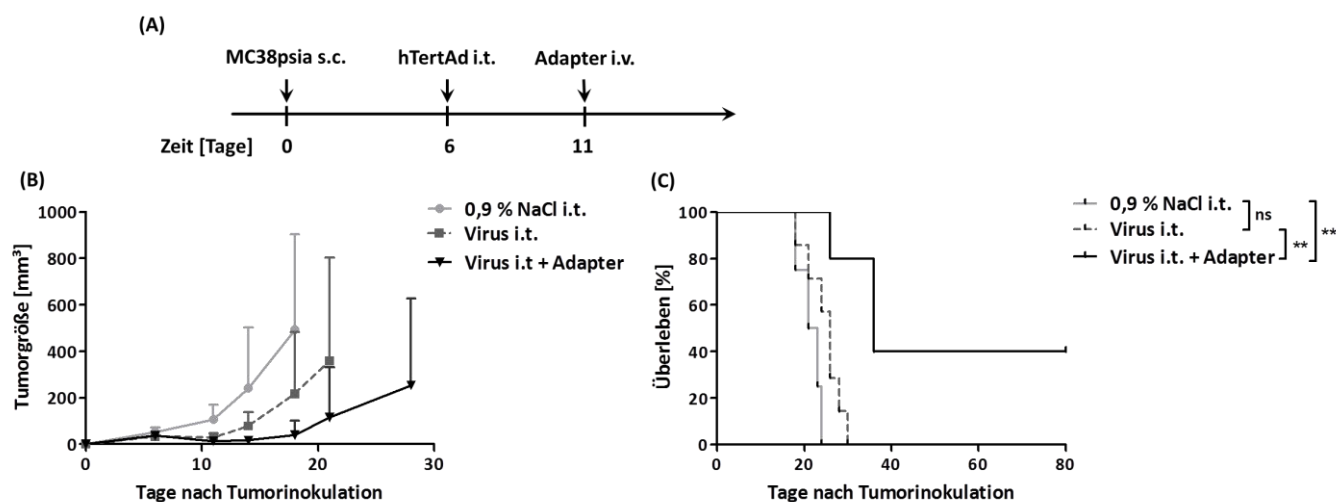


Abbildung 3.28: Die Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und Adapter-vermitteltem *Retargeting* getriggelter anti-viraler Antikörper ist eine hochwirksame anti-tumorale Therapieform

(A) Subkutane Tumore wurden in naiven Mäusen durch die Injektion von 1×10^7 MC38pSia Zellen etabliert. Sechs Tage nach Tumordinokulation erfolgte Virotherapie durch i.t. Injektion von 1×10^9 infektiösen Partikeln (ifu) des onkolytischen Adenovirus Serotyp 5 hTertAd. Die Kontrollgruppe erhielt eine i.t. Mock-Injektion von 0,9 % NaCl. Fünf Tage nach Virotherapie wurde ein Teil der virotherapierten Mäuse mit $50 \mu\text{g}$ Adapterprotein (DE1scFvpSia) i.v. behandelt. **(B)** Das Tumorstadium wurde beobachtet und das Überleben gemäß den definierten Abbruchkriterien (siehe 5.7.11) ermittelt. Der letzte definierte Messpunkt jeder Gruppe spiegelt dabei den letzten Messzeitpunkt wider, an dem alle Tiere der entsprechenden Gruppe noch lebten. **(C)** Mittleres Überleben in Tagen: Kontrollgruppe (0,9 % NaCl i.t.): 22 (n=4); Virus i.t.: 26 (n=5); Virus i.t. + Adapter 36 (n=5). **p<0,01

Behandelte Tumore wiesen nach intratumoraler Virotherapie ein etwas verlangsamtes Tumorstadium auf. In den ersten 5 Tagen nach Virotherapie war ein leichter Regress erkennbar, nach dieser Zeit

wuchsen die Tumore jedoch erneut, wenn auch mit einer geringeren Rate als die Tumore der Kontrollgruppe. Dies resultierte in einem tendenziellen, aber nicht statistisch signifikanten, verlängerten Überleben virotherapierter Individuen von durchschnittlich 26 Tagen im Vergleich zu 22 Tagen in der Kontrollgruppe. Im Rahmen der Sequenztherapie hingegen konnte die anschließende Adaptertherapie die initiale Regressionsphase in Folge der Virotherapie deutlich verlängern und auch das Tumorstadium nachhaltig verlangsamen. Diese starke anti-tumorale Wirkung der Sequenztherapie spiegelte sich ebenfalls in einem signifikant verlängerten mittleren Überleben wider. Dies konnte signifikant, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zur onkolytischen Virotherapie als Monotherapie, auf 36 Tage angehoben werden. Interessanterweise trat bei 2 von 5 Tieren sogar ein vollständiger Tumorregress ein. Diese Individuen blieben bis zum Ende des Versuchs an Tag 80 tumorfrei. Die Sequenztherapie aus Virotherapie und anschließender Adaptertherapie scheint anhand dieser Ergebnisse eine innovative und effektive neue Behandlungsstrategie für die Tumormimmuntherapie mit der Möglichkeit eines tumorfreien Langzeitüberlebens darzustellen.

3.5.1 Charakterisierung der tumorinfiltrierende Immunzellen in Folge der Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie

Um einen Eindruck über die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen hinter der Wirksamkeit der Sequenztherapie aus initialer onkolytischer Virotherapie und anschließendem Antikörper-*Retargeting* zu bekommen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie Gewebeproben entnommen und analysiert. Die genauen Analysezeitpunkte können der Abbildung 3.29 entnommen werden. Tumorgewebe wurde auf Infiltration durch verschiedene Leukozyten- sowie Lymphozytenpopulationen kurz nach initialer Virotherapie (Analysezeitpunkt I) sowie kurz nach der darauffolgenden Adaptergabe (Analysezeitpunkt II) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen untersucht (0,9 % NaCl i.t. bzw. 0,9 % NaCl i.t. und Virotherapie als Monotherapie). Quantifiziert wurden hierbei wie zuvor beschrieben die NK-Zellen, MDSCs und Makrophagen innerhalb der CD45.2-positiven Leukozytenpopulation sowie die Anteile an CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen innerhalb der CD90.2-positiven Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.3.1).

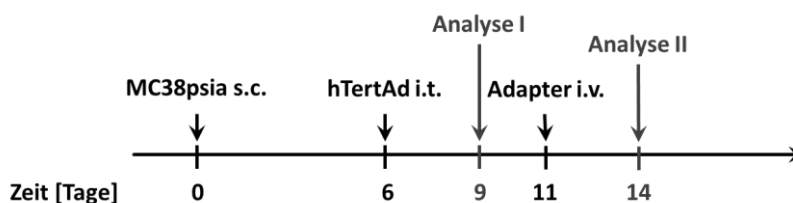


Abbildung 3.29: Analysezeitpunkte während der Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie

Der Versuchsablauf erfolgte wie in Abbildung 3.28 (A) beschrieben. An Tag neun (drei Tage nach Virotherapie) und 14 (drei Tage nach Adapter- bzw. acht Tage nach Virotherapie) wurden Tumore entnommen und auf infiltrierende Immunzellen untersucht.

Zur Charakterisierung der unmittelbar in Folge der Virotherapie getriggerten Immunzellen wurden drei Tage nach intratumoraler Virusinjektion Tumore entnommen und im Vergleich zu Kontrolltumoren (0,9 % NaCl i.t.) die tumorinfiltrierenden Immunzellen identifiziert. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Infiltration von NK-Zellen im Tumorgewebe virotherapierter Individuen im Vergleich zu Kontrollen die die Mock-Injektion (0,9 % NaCl) erhielten (Abbildung 3.30).

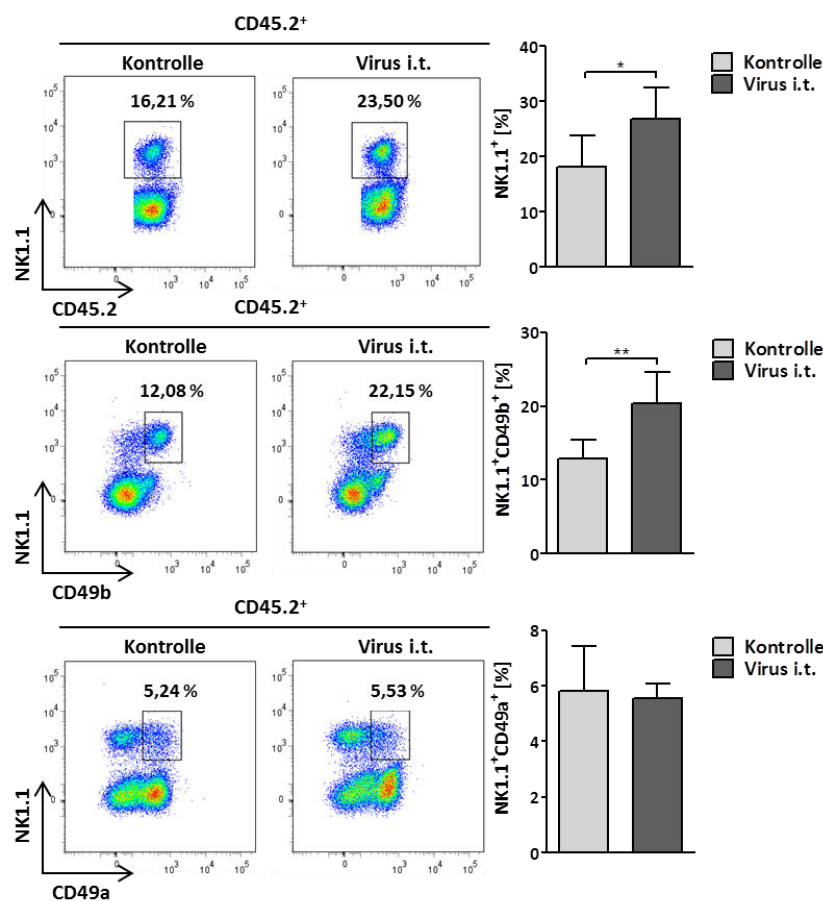


Abbildung 3.30: Intratumorale Virotherapie resultiert kurz nach der Behandlung in einer erhöhten Anzahl an NK-Zellen im Tumorgewebe

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.29 dargestellt durchgeführt. Drei Tage nach intratumoraler Virotherapie mit dem onkolytischen Adenovirus hTertAd oder 0,9 % NaCl Injektion (Kontrolle) wurden die tumorinfiltrierenden NK-Zellen innerhalb der CD45.2⁺ Leukozyten untersucht. Quantifiziert wurden die Anteile an NK1.1⁺, NK1.1⁺CD49b⁺ und NK1.1⁺CD49a⁺ Zellen innerhalb des Leukozyten-Gates (CD45⁺). n=5; *p<0.05; **p<0.01

Die Analysen zeigen eine signifikant erhöhte Frequenz an NK1.1-positiven Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten (CD45.2⁺) virotherapierter Tumore im Vergleich zu Mock-therapierten drei Tage nach der i.t. Injektion (26 % im Vergleich zu 18,1 %). Hierbei konnte die Analyse der konventionellen (NK1.1⁺CD49b⁺) und residenten (NK1.1⁺CD49a⁺) NK-Zellen sehr deutlich zeigen, dass die Vergrößerung des NK-Zellpools durch einen Anstieg an konventionellen NK-Zellen zu erklären ist. Diese NK-Zellpopulation stieg nach Virotherapie auf durchschnittlich 20,4 % an, während sie in der Kontrollgruppe nur bei ca. 12,9 % lag. Im Gegensatz dazu blieben die Anteile an residenten (NK1.1⁺CD49a⁺) NK-Zellen nach Virusinjektion unverändert.

Die Quantifizierung der myeloiden Zellen (Makrophagen und MDSCs) innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten zum gleichen Zeitpunkt zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3.31).

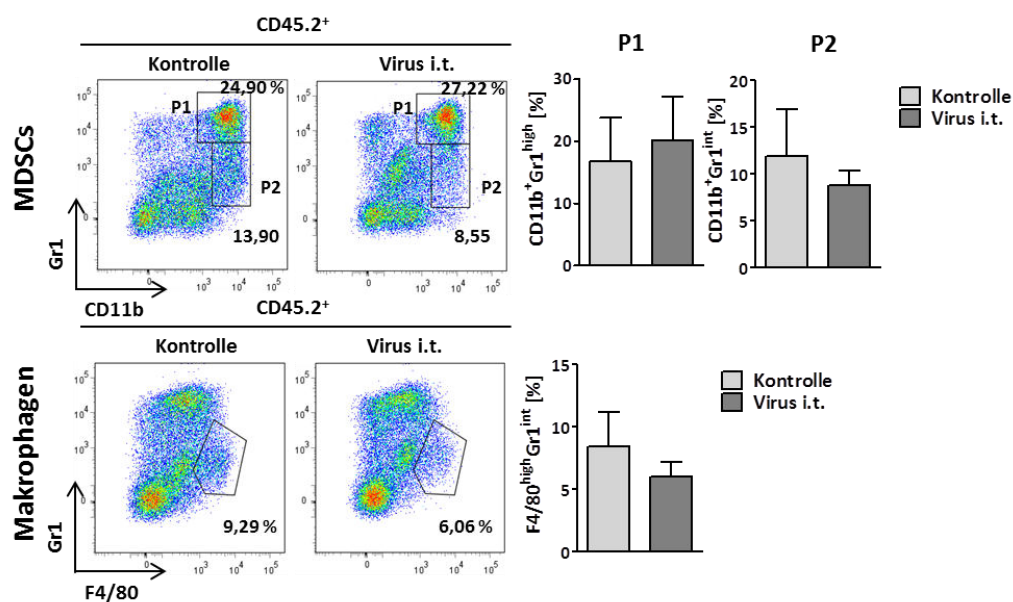


Abbildung 3.31: Die Frequenz tumorinfiltrierender MDSCs und Makrophagen ist kurz nach intratumoraler Virotherapie nicht signifikant verändert

Der Versuch wurde gemäß Abbildung 3.29 durchgeführt. Drei Tage nach i.t. Virotherapie mit dem onkolytischen Adenovirus hTertAd wurden die tumorinfiltrierenden Leukozyten im Durchflusszytometer isoliert und die Anteile an MDSCs (oben) in Form der Subpopulationen P1 (CD11b^{high}Gr1^{high}) und P2 (CD11b^{high}Gr1^{int}) sowie die Anteile an gereiften Makrophagen (Gr1^{int}F4/80^{high}) (unten) bestimmt. n=4

Bei der Analyse der MDSC Subpopulationen ist jedoch eine abnehmende Tendenz bei der Frequenz an den besonders immunsuppressiven Zellen mit intermediärer Gr1-Expression (P2 CD11b^{high}Gr1^{int}) zu erkennen. Ein ebenfalls abnehmender Trend ist im Anteil Makrophagen zu diesem frühen Zeitpunkt nach intratumoraler Virotherapie zu beobachten.

Im Gegensatz hierzu und insbesondere zum Einfluss der Virotherapie auf die tumorinfiltrierenden NK-Zellen war keine Wirkung auf die T-Zellanteile innerhalb der Lymphozytenpopulation (CD90.2⁺) im Tumor zum gleichen Zeitpunkt festzustellen (Abbildung 3.32)

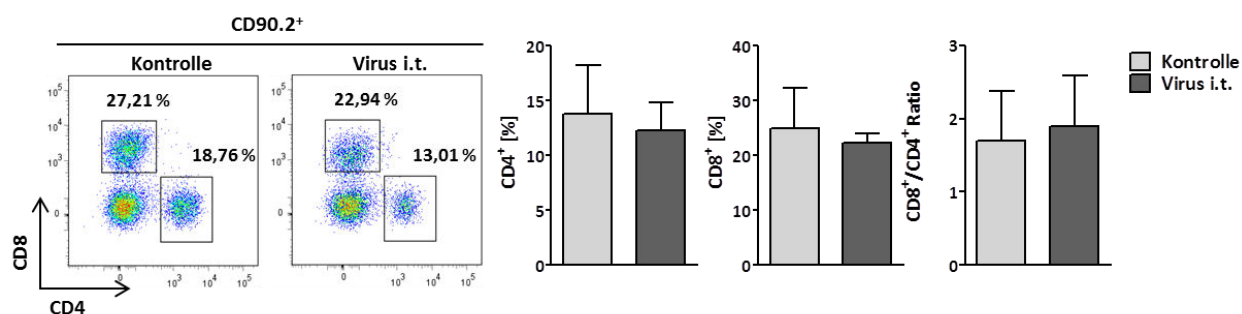


Abbildung 3.32: Kurz nach intratumoraler Virotherapie ist das Verhältnis von CD8 zu CD4 T-Zellen nicht verändert

Der Versuchsablauf erfolgte wie in Abbildung 3.29 beschrieben. Drei Tage nach intratumoraler Virusinjektion (hTertAd) bzw. Mock-Injektion (0,9 % NaCl (Kontrolle)) wurden die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (CD90.2⁺) mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Innerhalb der Lymphozytenpopulation wurden die prozentualen Anteile an CD4- und CD8-Zellen quantifiziert und das Verhältnis CD8⁺/CD4⁺ ermittelt. n=5

Bei der Quantifizierung der T-Lymphozytenpopulationen ließen sich weder signifikant veränderte Anteile an CD4- noch CD8-Zellen nachweisen. Dementsprechend zeigte sich auch im individuellen Verhältnis beider Populationen zu einander ($CD8^+/CD4^+$ Ratio) kein Unterschied zu Werten der Kontrollgruppe (i.t. Injektion von 0,9% NaCl).

Kurz nach intratumoraler Virotherapie scheinen somit insbesondere NK-Zellen in das Tumorgewebe rekrutiert zu werden, während die anderen untersuchten Zellpopulationen keine deutlichen Veränderungen in ihrer Frequenz aufweisen. Diese Daten ähneln den Ergebnissen der Analysen tumorinfiltrierender Immunzellen zum frühen Zeitpunkt nach Adaptertherapie deutlich (vgl. Abbildung 3.16-Abbildung 3.18). Auch kurz nach der Adapterbehandlung war eine starke Infiltration von (konventionellen) NK-Zellen zu beobachten, während sich andere Immunzellpopulationen in ihrer Quantität unverändert zeigten. Dies lässt vermuten, dass es in Folge der jeweiligen Monotherapien zunächst zu einer ähnlichen Konversion des Tumormikromillieus kommt bzw. zur Rekrutierung der gleichen Immunzelltypen in das Tumorgewebe.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Sequenztherapie aus initialer Virotherapie gefolgt von Adaptertherapie auf die infiltrierenden Immunzellen hat. Um dies zu adressieren, wurden Tumore nach sequenzieller Therapie drei Tage nach Adapterapplikation entnommen und analog zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen analysiert (vgl. Abbildung 3.29 Analysezeitpunkt II: drei Tage nach Adaptergabe bzw. 8 Tage nach Virotherapie). Die tumorinfiltrierenden Zellen wurden vergleichend zu Kontrolltieren ohne Therapie (0,9 % NaCl i.t.) und virotherapierten Tieren ohne anschließende Adaptertherapie (entspricht einem Zeitpunkt 8 Tage nach Virotherapie i.t.) untersucht. Die Analyse der tumorinfiltrierenden NK-Zellen drei Tage nach Adaptertherapie bzw. acht Tage nach i.t. Virotherapie (Versuchsablauf laut Abbildung 3.29, Analysezeitpunkt II) zeigte ausgeprägte Veränderung nach der Sequenztherapie als zu diesem Zeitpunkt nach alleiniger Virotherapie und Proben aus untherapierten Kontrolltieren (0,9 % NaCl i.t.) (siehe Abbildung 3.33).

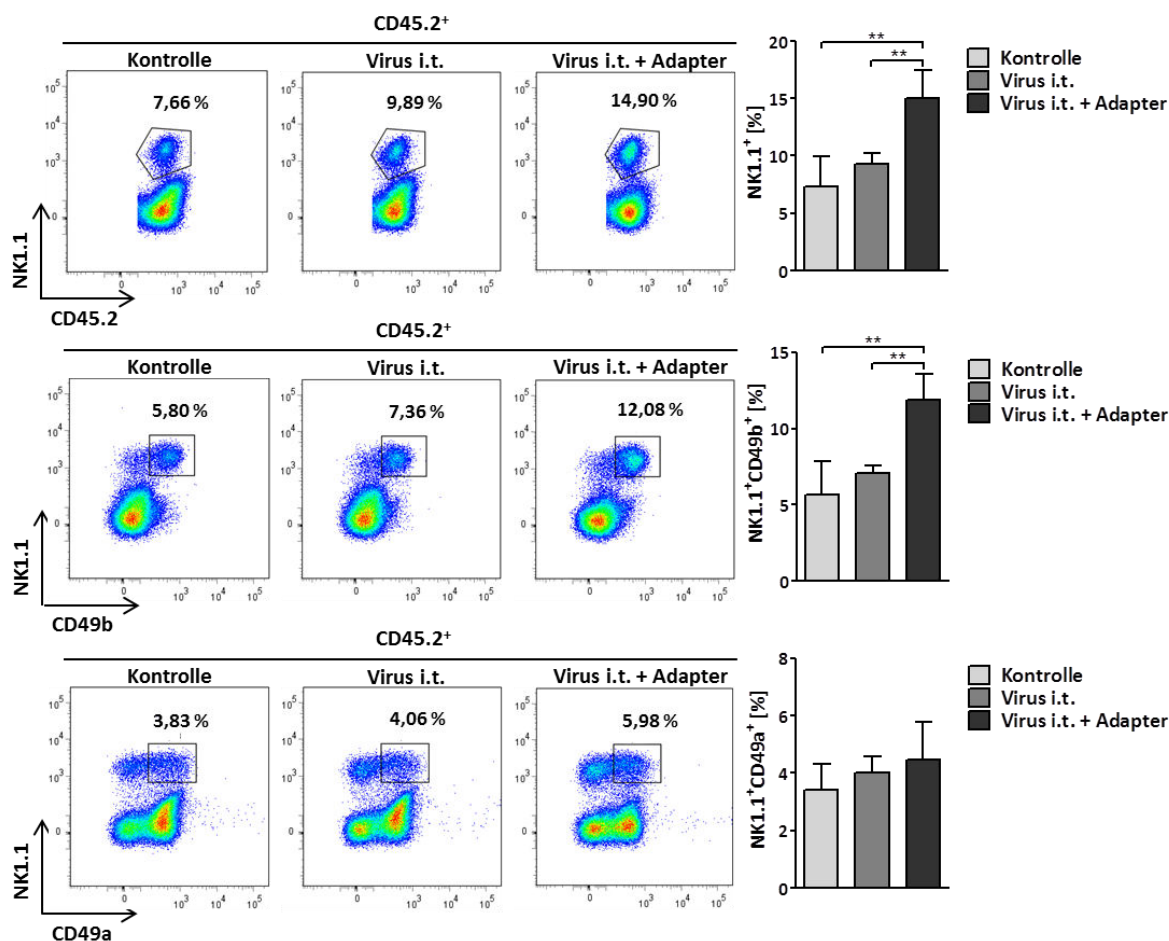


Abbildung 3.33: Sequenzielle Therapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einer starken Infiltration des Tumorgewebes durch NK-Zellen

Der Versuchsablauf erfolgte entsprechend Abbildung 3.29. 14 Tage nach Tumoringokulation ($\hat{=}$ Analysezeitpunkt II bzw. acht Tage nach Virotherapie und drei Tage nach Adaptertherapie) wurden die tumorinfiltrierende Leukozyten (CD45.2⁺) mittels Durchflusszytometrie identifiziert und die NK-Zellanteile quantifiziert. Bestimmt wurden die Populationen an NK1.1⁺-Zellen, sowie konventionellen (NK1.1⁺CD49b⁺) und residenten (NK1.1⁺CD49a⁺) NK-Zellen. n=4; ** p<0,01.

Acht Tage nach intratumoraler Virusinjektion allein sind nur tendenziell erhöhte Werte an NK-Zellen im Vergleich zu den Werten der Kontrolle festzustellen. Diese Tendenz kann in allen drei analysierten Zellpools einheitlich beobachtet werden. Prägnant wurde allerdings der Anstieg an NK1.1⁺ bzw. NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen nach zusätzlicher Adaptertherapie. Der Anteil an NK1.1⁺ Zellen wuchs um mehr als 100 % an im Vergleich zur Kontrolle (15 % der CD45.2⁺ im Vergleich zu 7,4 %). Diese Veränderung konnte deutlich durch einen Anstieg der konventionellen NK-Zellen erklärt werden, deren Anteil sich im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls mehr als verdoppelte (11,9 % verglichen mit 5,7 %). Dieser Anstieg war ebenso deutlich gegenüber der Monotherapie (alleinige Virotherapie: 7,1 %). Währenddessen zeigte sich in den Anteilen residenter NK-Zellen lediglich ein Anstiegstrend von den geringsten Werten in Kontrolltumoren, über leicht erhöhte Werte nach Viro- und nochmals geringfügig erhöhte Werte nach der Sequenztherapie.

Die Analyse der MDSCs zeigt zu diesem Analysezeitpunkt ebenfalls wesentliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abbildung 3.34 oben)

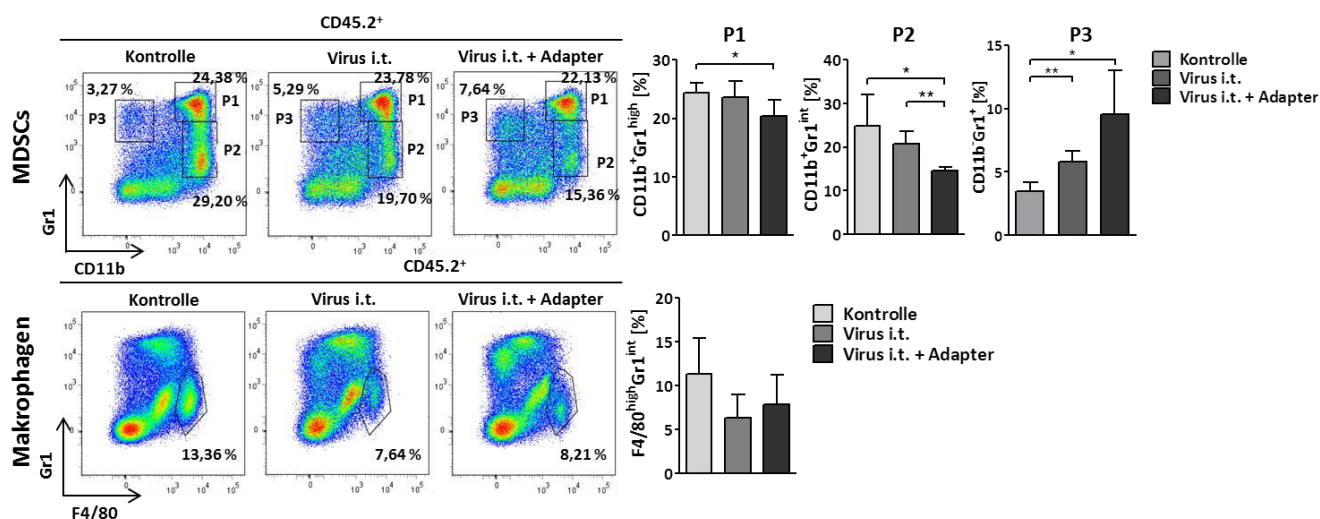


Abbildung 3.34: Die Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie führt zu einer Abnahme immunsuppressiver MDSCs sowie zu einem deutlichen Anstieg einer nicht myeloiden Gr1⁺ Zellpopulation im Tumorgewebe

Der Versuch wurde gemäß Abbildung 3.29 durchgeführt. 14 Tage nach Tumorinokulation ($\hat{=}$ Analysezeitpunkt II bzw. acht Tage nach Virotherapie und drei nach Adaptertherapie) wurden die tumorinfiltrierende Leukozyten (CD45.2⁺) im Durchflusszytometer isoliert und die Anteile an MDSCs (oben) in Form der Subpopulationen P1 (CD11b⁺Gr1^{high}) und P2 (CD11b⁺Gr1^{int}) sowie die Anteile an gereiften Makrophagen (Gr1^{int}F4/80^{high}) (unten) bestimmt. Zudem wurde die Veränderung einer auffälligen nicht myeloiden (CD11b-negativen) Zellpopulation mit hoher Gr1-Expression P3 (CD11b⁻Gr1⁺) quantifiziert. n=4 *p<0.05; **p<0.01

Acht Tage nach intratumoraler Virotherapie ist eine tendenzielle Abnahme der stark immunsuppressiven P2-Population der MDSCs innerhalb der Leukozyten im Tumorgewebe gegenüber der Kontrolle festzustellen. Diese Abnahme wird durch eine nachfolgende Adapterbehandlung deutlich verstärkt und führt gegenüber der Kontrolle zu einer Halbierung der Frequenz dieser immunsupprimierenden Zellen im Tumor. Nur in Folge der Sequenztherapie, aber nicht zu diesem Zeitpunkt nach alleiniger Virotherapie kommt es gleichzeitig zu einer Reduktion der weniger immunsuppressiven MDSCs (P1). Sowohl in Folge der Monotherapie (Virotherapie allein) als auch der Sequenztherapie ist eine deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante, Abnahme der Makrophagenpopulation im Tumorgewebe festzustellen. Dies ist möglicherweise durch die Makrophagen-vermittelte Phagozytose apoptotischer Zellen und deren Abtransport aus dem Gewebe zu erklären. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde eine weitere, bisher in dieser Form noch nicht untersuchte Zellpopulation apparent, deren Anteil sich nach Virotherapie und insbesondere nach der Kombinationstherapie innerhalb der tumorinfiltrierenden Leukozyten erhöht. Hierbei handelt es sich um Gr1-positive und gleichzeitig CD11b-negative Zellen (P3) (siehe Abbildung 3.34 oben). Ihr Anteil ist nach Virotherapie deutlich erhöht verglichen mit Kontrollwerten (3,5 % vs. 5,8 %) und in Folge der der Sequenztherapie nochmals signifikant höher (9,6 %). Bei genauerer Betrachtung findet sich eine entsprechende Population auch in den FACS-Plots der Makrophagen-Analyse (Abbildung 3.34 unten). Dort zeichnet sich eine Gr1-positive F4/80-negative

Zellpopulation ab, die ebenfalls nach Virotherapie aber insbesondere nach der Sequenztherapie zunimmt. Es ist bekannt, dass es eine Gr1-exprimierende Subpopulation an CD8 T-Zellen gibt, die sich unter anderem durch eine besonders schnelle und hohe IFN γ -Ausschüttung nach Antigenkontakt auszeichnen (Atsumi et al., 2009). Um den Charakter der hier vorliegenden Gr1-positiven Zellen in diesem Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde zum gleichen Zeitpunkt die Existenz und die Frequenz Gr1-positiver CD8-Zellen sowohl innerhalb der Leukozyten als auch innerhalb der Lymphozyten bestimmt (Abbildung 3.35).

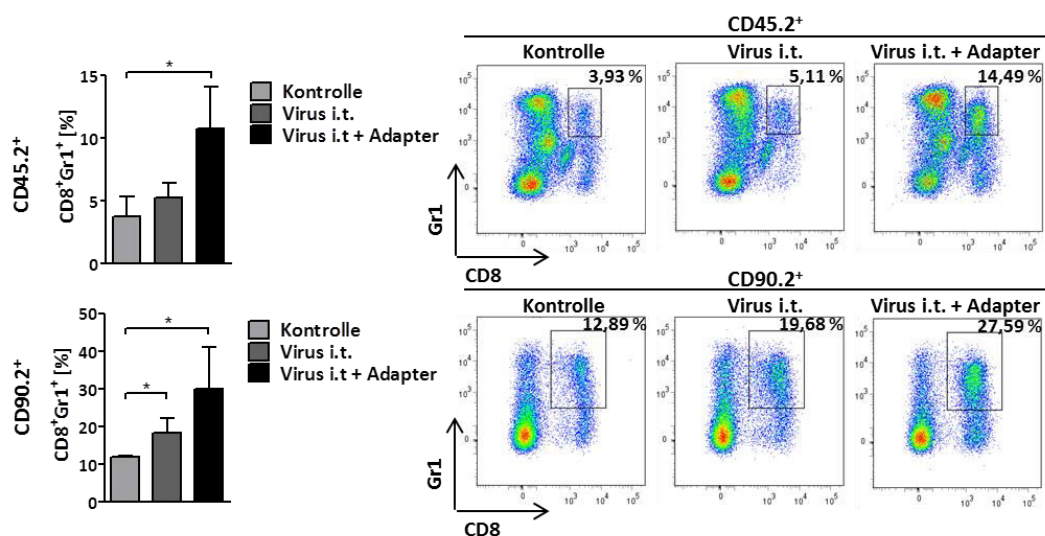


Abbildung 3.35: Die Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in der Zunahme Gr1-positiver CD8 T-Zellen im Tumorgewebe

Der Versuch wurde laut Abbildung 3.29 durchgeführt. Tumorgewebe wurde zum Analysezeitpunkt II (Acht Tage nach Virotherapie bzw. drei Tage nach Adaptertherapie) entnommen. Tumor-infiltrierende Leukozyten (CD45.2⁺) und Lymphozyten (CD90.2⁺) wurden mittels Durchflusszytometrie identifiziert und die enthaltenen Anteile an CD8⁺Gr1⁺-Zellen quantifiziert. n=3; *p<0.05

Bei der Analyse der Leukozyten (CD45.2⁺-Zellen) im Tumorgewebe ließ sich in allen Gruppen eine CD8GR1-koexprimierende Population nachweisen. Diese stieg im Vergleich zu Kontrollwerten nach Virotherapie allein leicht und nach der Sequenztherapie deutlich an. Die Verhältnisse zwischen den Gruppen ähneln dabei klar den Werten der oben beschriebenen Gr1⁺CD11b⁻ Populationen (Abbildung 3.34 oben). Deutlicher wird dies nochmals, wenn man den Anteil der Gr1⁺CD8⁺-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenpopulation quantifiziert. Hier wird die Korrelation sehr markant und es zeigt zudem, dass es sich tatsächlich um CD8 T-Zellen handelt.

Bei der weiteren Untersuchung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten zeigten sich sowohl in Folge der Virotherapie allein als auch im besonderen Maße nach der Sequenztherapie weitere Veränderungen in den T-Zellpopulationen zu diesem Zeitpunkt der Analyse (Abbildung 3.36).

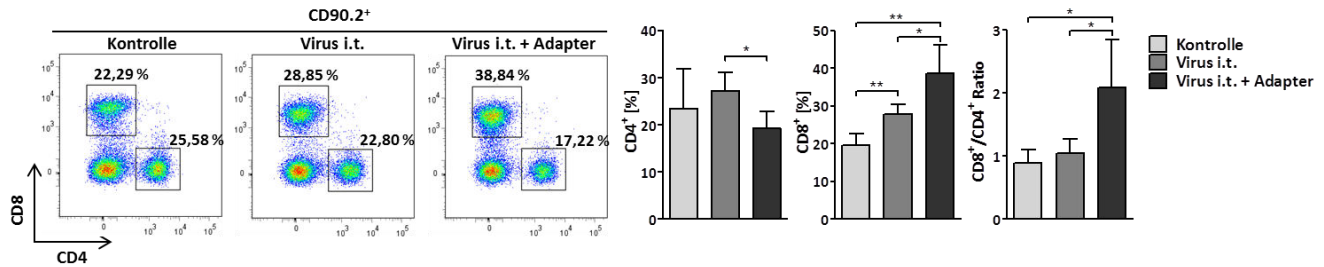


Abbildung 3.36: Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einem zu Gunsten von CD8 T-Zellen verschobenen CD8/CD4 Verhältnis im Tumor

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.29 ersichtlich durchgeführt und 14 Tage nach Tumorinokulation (Analysezeitpunkt II \pm acht Tage nach Virotherapie bzw. drei Tage nach Adaptertherapie) die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (CD90.2⁺) identifiziert. Innerhalb der CD90.2⁺ Zellen wurden die Anteile an CD4⁻ und CD8⁻Zellen bestimmt und das Verhältnis (Ratio) dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n=4$

Acht Tage nach Virotherapie fanden sich leicht erhöhte Anteile an tumorinfiltrierenden CD4 T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (27,3 % vs. 23,5 %). Dieser Anstieg wurde durch den anschließenden Einsatz des Adapters wieder signifikant verringert (auf 19,4 % nach Kombinationstherapie) und sank zum Analysezeitpunkt (drei Tage nach der Adaptergabe) unter den Wert der Kontrollgruppe. Die Quantifizierung der CD8-positiven T-Zellen zeigte eine deutliche Expansion dieser Population in Folge der Virotherapie als auch nach der Sequenztherapie. Dabei konnte der CD8-Anteil von 19,6 % in der Kontrollgruppe auf 27,7 % acht Tage nach i.t. Virusinjektion und nochmals sehr deutlich auf 38,5 % nach Sequenztherapie angehoben werden. Damit konnte die Sequenztherapie im Vergleich zur Kontrolle einen nahezu 100-prozentigen Zuwachs in der CD8-Population bewirken. Diese Veränderungen resultieren in einem deutlich zu Gunsten von CD8 T-Zellen verschobenen CD8⁺/CD4⁺-Verhältnis im Tumor nach adapterunterstützter Virotherapie im Vergleich zur Kontrolle (CD8⁺/CD4⁺-Ratio von 2,09 vs. 0,89). Diese Verschiebung konnte im gleichen Ausmaß durch Virotherapie allein nicht erzielt werden (Ratio 1,04). Diese Entwicklung deutet auf eine Polarisierung in Richtung eines eher zytotoxischen (CD8-dominierten) Phänotyps des Tumormikromillieus in Folge der Sequenztherapie hin. Dies ist möglicherweise ausschlaggebend für die teilweise vollständigen Tumorremissionen, die nur in Folge der Sequenztherapie aber nicht durch die Monotherapie erzielt werden konnten.

Zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf der Sequenztherapie waren leider keine aussagekräftigen Analysen der tumorinfiltrierenden Immunzellen mehr möglich, da wenige Tage nach dem hier analysierten Zeitpunkt (acht Tage nach Viro- bzw. drei Tage nach Adaptertherapie) einige Individuen der Gruppe, die die Sequenztherapie erhielten eine vollständige Tumorremission aufwiesen. Diese tumorfreien Tiere verhinderten eine repräsentative Analyse innerhalb der Gruppe. Es erfolgte jedoch zu einem späteren Zeitpunkt vergleichend eine Untersuchung zur Induktion systemischer Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten (siehe 3.5.2).

3.5.2 Induktion von Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantworten durch die Sequenztherapie

Es ist bekannt, dass während der Tumortherapie mit onkolytischen Viren systemische anti-tumorale CD8 T-Zellantworten induziert werden können (Ramakrishna et al., 2009; Tuve et al., 2009). Um zu untersuchen, in wie fern die Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie in der Lage ist, systemische Tumorantigen-spezifische CD8 T-Zellen zu triggern bzw. eine durch die Virotherapie induzierte Antwort zu amplifizieren, wurden 13 Tage nach Viro- bzw. acht Tage nach Adaptertherapie die Splenozyten der Mäuse isoliert (Abbildung 3.37 (A)). Diese wurden im Anschluss wie zuvor beschrieben exemplarisch mit dem mutierten MC38-Antigen Adpgk oder einem irrelevanten Kontrollpeptid stimuliert (siehe Abbildung 3.22). Die daraufhin IFN γ -produzierenden CD8-Zellen wurden im Durchflusszytometer identifiziert und quantifiziert (Abbildung 3.37 (B)).

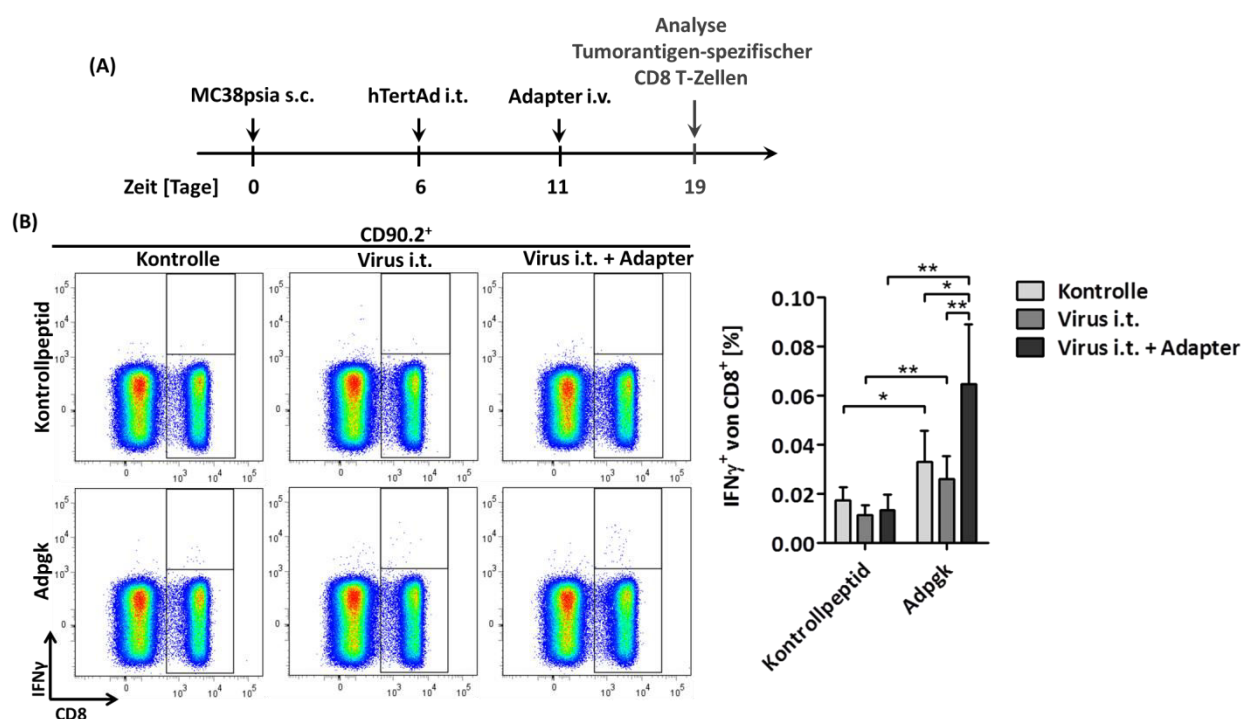


Abbildung 3.37: Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einer Amplifikation der Virotherapie-induzierten Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantwort

(A) Der Versuch wurde analog wie zuvor in Abbildung 3.28 beschrieben durchgeführt dargestellt durchgeführt. An Tag 19 (\cong 13 Tage nach Viro- bzw. acht Tage nach Adaptertherapie) wurden die Splenozyten der Mäuse aufgereinigt, über Nacht mit dem MC38-Peptid Adpgk oder einem irrelevanten Kontrollpeptid inkubiert und die Sekretion von IFN γ aus den Zellen durch Zugabe von Brefeldin A unterbunden (Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit PMA/Ionomycin, hier nicht dargestellt). **(B)** Im Anschluss wurden im Durchflusszytometer erst die Lymphozyten (CD90.2⁺) identifiziert und anschließend die IFN γ -positiven CD8 T-Zellen quantifiziert. Virus i.t und Virus i.t + Adapter: n=7; Kontrolle: n=6; *p<0.05; **p<0.01

Die Quantifizierung der IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen nach Stimulation zeigt zunächst, dass auch in den Splenozyten der Kontrollgruppe eine geringe Frequenz Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen gemessen werden konnte. Diese Frequenz war jedoch nur tendenziell und nicht statistisch signifikant höher im

Vergleich zur Frequenz an CD8-Zellen, die sich durch das irrelevante Kontrollpeptid stimulieren ließen. In Folge der alleinigen Virotherapie konnte ein leicht höherer Anteil Tumorantigen-spezifische CD8 T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dieser Anteil erreichte auch gegenüber der Stimulation mit dem Kontrollpeptid statistische Signifikanz. Klar zu erkennen ist jedoch ein starker Anstieg der Adpgk-spezifischen CD8 T-Zellen nach der Sequenztherapie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu der Gruppe, die nur Virotherapie erhalten hat, war ein sehr deutlicher Anstieg von über 100 % festzustellen. Dies bestätigt, dass sich die Triggerung Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen durch die sequenzielle Therapie aus initialer Virotherapie gefolgt von Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargeting* gegenüber der Virotherapie allein wesentlich verstärken lässt.

3.6 Untersuchungen zum Antikörper-*Retargeting* als Initiationstherapie für Immuncheckpoint-Blockade

Die zuvor erhaltenen Daten zeigen, dass sich durch den Einsatz der Adaptertherapie die Menge tumorinfiltrierender CD8 T-Zellen positiv beeinflussen lässt, sowie die Induktion von Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen unterstützt wird. Der Grad der CD8 T-Zellinfiltration ist ein wichtiger Faktor für das Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren (Gajewski et al., 2013). Daher könnte ein Adapter-vermitteltes Antikörper-*Retargeting* eine geeignete Basis für eine anschließende Immuncheckpointblockade bilden. Um die Wirksamkeit eines entsprechenden therapeutischen Konzepts zu untersuchen, wurde die anti-tumorale Effektivität einer Immuncheckpointblockade gegen PD-1 allein und im Kontext einer Adaptertherapie verglichen. Für die Untersuchungen wurden subkutane MC38pSia-Tumore in (Ad5-) immunisierten Mäusen etabliert und die Tiere beginnend an Tag 7 nach Tumorinokulation mit einem α PD-1 Antikörper bzw. Adapterprotein und α PD-1 Antikörper behandelt (siehe Abbildung 3.38).

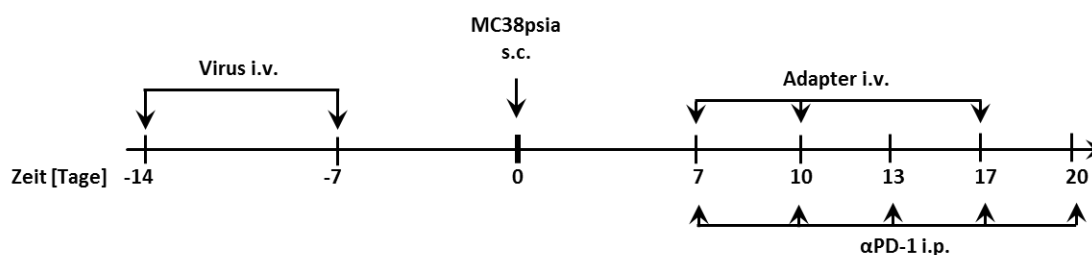


Abbildung 3.38: Versuchsablauf zur Untersuchung einer synergistischen Wirkung von Adaptertherapie und α PD-1 Immuncheckpointblockade

Die Mäuse wurden gegen Adenovirus immunisiert und subkutane Tumore durch die Injektion von 1×10^7 MC38pSia-Zellen etabliert. PD-1 Blockade erfolgte an Tag 7, 10, 13, 17 und 20 nach Tumorinokulation durch i.p. Injektion eines α PD-1 Antikörpers. Adaptertherapie wurde an Tag 7, 10 und 17 nach Zellinjektion i.v. mit jeweils 50 μ g Adapterprotein appliziert.

Das Tumorstadium sowie das Überleben wurde im Folgenden vergleichend in Tieren mit PD-1 Blockade und Mäusen mit PD-1 Blockade und Adaptertherapie dokumentiert. Die Werte wurden zudem

zur Verdeutlichung der Wirkung der Monotherapie (PD-1 Blockade allein) mit zuvor erhaltenen Daten von unbehandelten Kontrollmäusen verglichen (Abbildung 3.39).

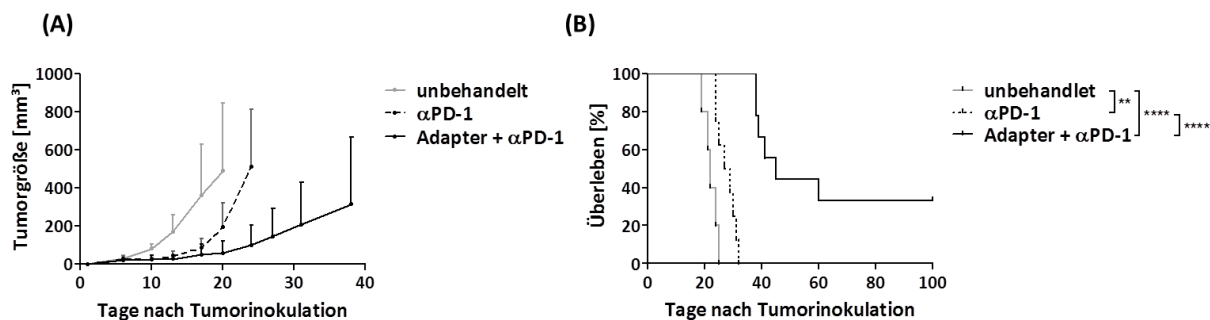


Abbildung 3.39: Adaptertherapie als Basis einer PD-1 Immuncheckpointblockade ist einer αPD-1 Monotherapie deutlich überlegen

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.38 beschrieben durchgeführt. **(A)** Dargestellt ist das Tumorwachstum unter PD-1 Blockade oder PD-1 Blockade und Adaptertherapie vergleichend zu Daten aus unbehandelten Individuen aus Vorversuchen (vgl. Abbildung 3.8 Mitte). Der letzte definierte Messpunkt jeder Gruppe spiegelt dabei den letzten Messzeitpunkt wider, an dem alle Tiere der entsprechenden Gruppe noch lebten. **(B)** Tiere wurden nach Erreichen eines der Abbruchkriterien (siehe 5.7.11) getötet und das mittlere Überleben je Gruppe bestimmt. Mittleres Überleben in Tagen: unbehandelt: 22; αPD-1: 28; Adapter + αPD-1: 45; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (**A**) $n=5$ mit Ausnahme der αPD-1 Gruppe mit $n=4$, (**B**) unbehandelt: $n=5$; αPD-1 & αPD-1 Adapter $n=9$ (aus 2 unabhängigen Versuchen)

PD-1 Immuncheckpointblockade als Monotherapie führte zu Beginn der Therapie zu einem Tumorwachstumsarrest. Ca. zehn Tage nach Therapiestart zeigte sich jedoch erneutes Tumorwachstum bei allen Mäusen der Gruppe, das trotz anhaltender Therapie nach wenigen Tagen in einen deutlichen Tumorprogress überging. Das mittlere Überleben betrug in dieser Gruppe 28 Tage. Im Vergleich zu Daten unbehandelter Individuen aus vorherigen Versuchen konnte die PD-1 Blockade allein somit das Überleben bereits signifikant anheben (mittleres Überleben unbehandelt: 22 Tage). Diese anti-tumorale Wirkung ließ sich allerdings im Kontext einer Adapterbehandlung noch wesentlich steigern. Hierbei hielt der Wachstumsarrest über die gesamte Länge der PD-1 Therapie an und führte in drei von neun Individuen zu einer vollständigen Tumorremission. Das mittlere Überleben konnte eindrucksvoll auf 45 Tage angehoben werden. Dies entspricht einer Verdopplung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren aus vorherigen Versuchen. Zudem ist zu bemerken, dass alle drei Tiere, bei denen ein vollständiger Tumorregress zu beobachten war, bis zum Ende des Versuchs an Tag 100 tumorfrei blieben.

Diese Daten zeigen, dass ein Antikörper-vermitteltes *Retargeting* anti-adenoviraler Antikörper gegen den Tumor eine geeignete Basis für eine wirksame Immuncheckpointblockade ist. Die therapeutische Effektivität kann im Vergleich zur Immuncheckpointblockade als Monotherapie hierbei maßgeblich angehoben werden.

3.6.1 Induktion von Tumor-spezifischen CD8 T-Zellantworten durch Adapter-unterstützte PD-1 Immuncheckpointblockade

Im Rahmen der Tumorimmuntherapie trägt eine PD-1 Blockade wesentlich zur Induktion bzw. Amplifikation Tumor-gerichteter T-Zellantworten bei. Im Hinblick darauf sollte untersucht werden, in wie fern die Adapter-unterstützte PD-1 Blockade in der Lage ist, gegenüber der α PD-1 Monotherapie die Frequenz Tumorantigen-spezifischer T-Zellantworten zu beeinflussen. Zur Analyse der nach PD-1 Immuncheckpointblockade bzw. der Adapter-unterstützten PD-1 Blockade induzierten systemischen T-Zellantworten wurden zunächst die Splenozyten der Individuen jeweils nach Erreichen eines der Abbruchkriterien (siehe 5.7.11) aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit dem mutierten MC38-Antigen Adpgk wie zuvor beschrieben (siehe 3.3.2) und die Quantifizierung IFN γ -produzierender CD8 T-Zellen im Durchflusszytometer (Abbildung 3.40 (A)). Da diese Probennahme aufgrund des unterschiedlichen Überlebens innerhalb der Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn erfolgte, wurde, um bessere Vergleiche zwischen den Gruppen ziehen zu können, zusätzlich nach Ende der Therapiephase (Tag 24) einheitlich Blut entnommen. Analog zur Untersuchung der Adpgk-spezifischen CD8 T-Zellantwort innerhalb der Splenozyten wurde diese im dem Blut der Individuen bestimmt (Abbildung 3.40 (B)). Die Quantifizierung der Adpgk-spezifischen CD8-Antworten innerhalb der Splenozyten zeigt, dass es bereits in Folge der PD-1 Immuncheckpointinhibition allein zu einer deutlichen Population Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz kommt. Erfolgt jedoch eine PD-1 Blockade auf Basis der Adaptertherapie, so lässt sich die Frequenz dieser Zellen innerhalb der Splenozyten deutlich um mehr als das zweifache steigern (0.16 % IFN γ ⁺ CD8 Zellen im Vergleich zu 0.07 %). Die Interpretation dieser Daten ist jedoch hinsichtlich ihrer Aussagekraft schwierig, da die analysierten Splenozyten nicht zum gleichen Zeitpunkt nach Therapiebeginn entnommen wurden. Um eine repräsentative Aussage über die Wirkung der α -PD-1 Monotherapie im Vergleich zur Adapter-unterstützten Immuncheckpointinhibition auf die Tumor-spezifische CD8 T-Zellantwort treffen zu können, wurden Blutproben beider Gruppen zum gleichen Zeitpunkt entnommen (Tag 24 nach Tumorinokulation). Die entsprechenden Adpgk-spezifischen CD8 T-Zellanteile im Blut finden sich in Abbildung 3.40 (B).

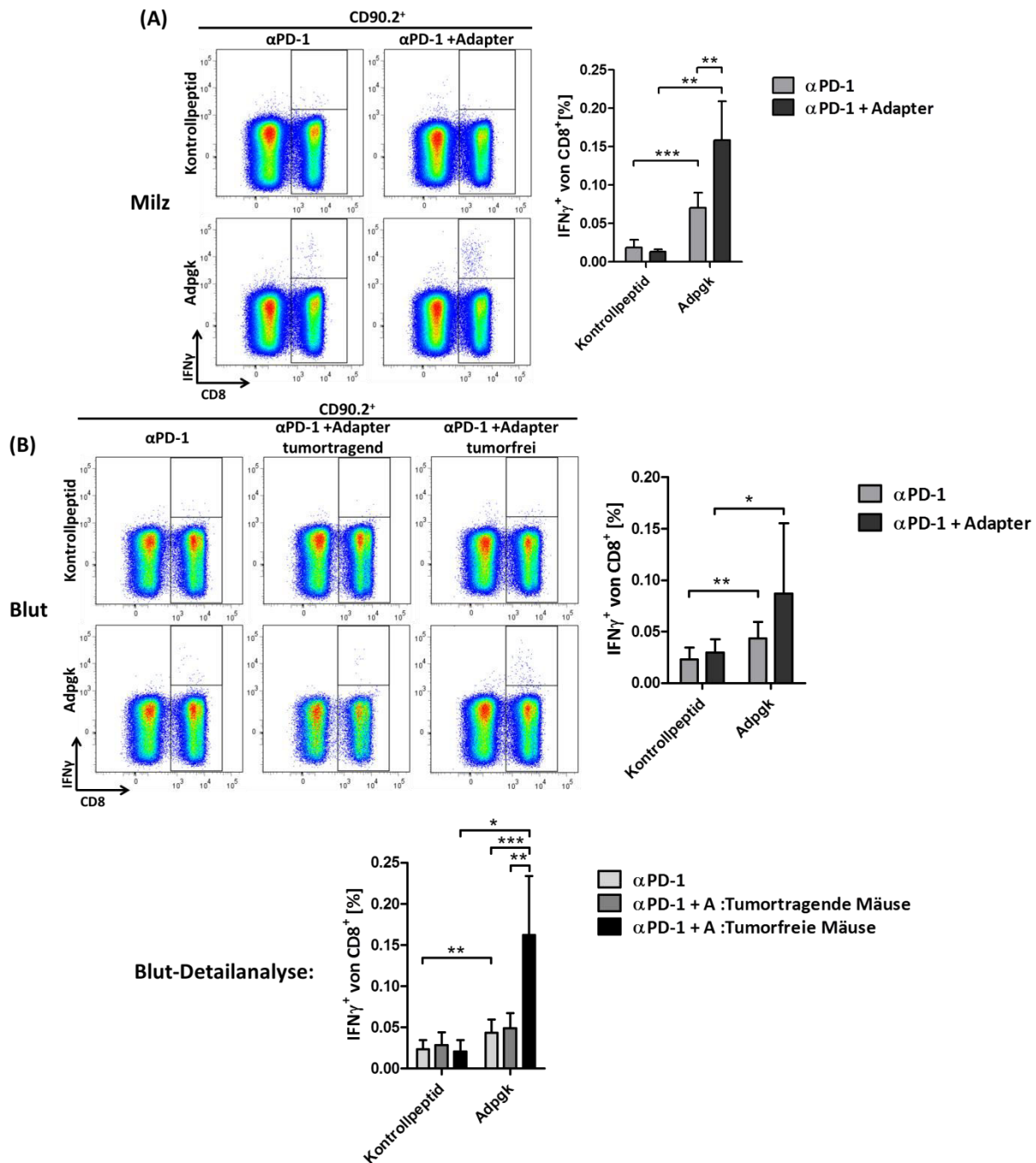


Abbildung 3.40: Adaptertherapie als Basis einer Immuncheckpointblockade resultiert in einer deutlich höheren Frequenz Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in Milz und Blut verglichen zur PD-1 Blockade als Monotherapie

Der Versuch erfolgte gemäß Abbildung 3.38. Nach Erreichen eines der Abbruchkriterien (siehe 5.7.11) wurden die Tiere getötet und einem Teil der Versuchstiere die Milz entnommen (αPD-1 Gruppe: Tag 24, 25, 27, 30, 31, 32; αPD-1+ Adapter Gruppe: Tag 38, 39, 41, 60) An Tag 24 wurden zudem Blutproben genommen. Die Immunzellen aus (A) Milz und (B) Blut wurden mit dem MC38-Antigen Adpgk oder einem irrelevanten Kontrollpeptid stimuliert und die IFNγ Sekretion durch Zugabe von Brefeldin A verhindert (Als Positivkontrolle erfolgte die Stimulation mit PMA/Ionomycin, nicht gezeigt). Mittels Durchflusszytometrie wurden die CD90.2⁺ Lymphozyten identifiziert und im Anschluss die IFNγ⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ Lymphozyten bestimmt. αPD-1: Blut n=9 und Milz n=6; αPD-1 + Adapter Blut: n=9 (davon 3 tumorfrei) und Milz n=4. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

In beiden Gruppen (αPD-1 +/- Adapter) ließen sich im Blut der Mäuse Adpgk-spezifische CD8 T-Zellen nachweisen. Die kombiniert therapierten Tiere erreichten jedoch wesentlich höhere Anteile an Tumor-

spezifischen T-Zellen im Vergleich zu monotherapierten (nur α PD-1) Individuen (0.09 % IFN γ ⁺ CD8-Zellen verglichen mit 0.04 %). Bei genauerer Auftrennung der Daten nach Adaptertherapie und PD-1 Blockade, in tumorfreie (n=3) und tumortragende Tiere (n=6), ist deutlich zu erkennen, dass eine besonders hohe Adpgk-spezifische CD8 T-Zellantwort mit einem vollständigen Tumorregress korreliert. Tumorfreie Mäuse wiesen weit ausgeprägtere T-Zellantworten im Vergleich zu den tumortragenden der gleichen Gruppe auf (0.16 % IFN⁺ CD8-Zellen vs. 0.05 %), deren Antworten nicht signifikant höher lagen als unter Immuncheckpointblockade allein.

Zusammenfassend konnte eine deutlich synergistische Wirkung von Adaptertherapie und Immuncheckpointblockade gezeigt werden, einhergehend mit einem signifikanten Anstieg Tumorantigen-spezifischer T-Zellantworten in Blut und Milz behandelter Tiere. Diese synergistische Wirkung resultierte in einem deutlich verlängerten Überleben mit tumorfreiem Langzeitüberleben in 33 % der therapierten Mäuse.

3.6.2 Therapeutische Effizienz einer Immuncheckpointblockade während der etablierten Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem Antikörper-Retargeting

Im Rahmen der unter 3.5 entwickelten Sequenztherapie aus initialer Virotherapie gefolgt von einem Adapter-vermittelten Antikörper-Retargeting konnte eine massive Infiltration von CD8 T-Zellen in das Tumorgewebe beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.36). Zudem kam es zu einer deutlichen Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in der Milz behandelter Individuen (vgl. Abbildung 3.37). Diese Daten lassen vermuten, dass möglicherweise eine Immuncheckpointblockade im Kontext dieser Sequenztherapie besonders wirkungsvoll ist. Im vorangegangenen Kapitel konnte bereits eine synergistische Wirkung aus Adaptertherapie und Immuncheckpointinhibition gezeigt werden. Letztendlich sollte nun untersucht werden, in wie fern die Sequenztherapie als Basis einer PD-1 Blockade die anti-tumorale Wirkung der Immuncheckpointblockade unterstützen kann. Im Folgenden wurden die Therapiestrategien aus den bisherigen Versuchen in einem integrierten Behandlungsschema zusammengeführt (siehe Abbildung 3.41). Hierbei sollten die in Folge der Sequenztherapie aus initialer onkolytischer Virotherapie und anschließender Adaptertherapie getriggerten CD8 T-Zellantworten durch eine begleitende PD-1 Blockade amplifiziert werden. Es wurden hierzu subkutane MC38pSia-Tumore in naiven Mäusen etabliert und an Tag sechs nach Tumoringokulation mit dem onkolytischen Adenovirus hTertAd i.t. therapiert. Im Anschluss erhielten die Tiere einmalig Adaptertherapie und über zwei Wochen Immuncheckpointblockade (α PD-1), nur PD-1-Blockade oder blieben im Weiteren unbehandelt (Abbildung 3.41).

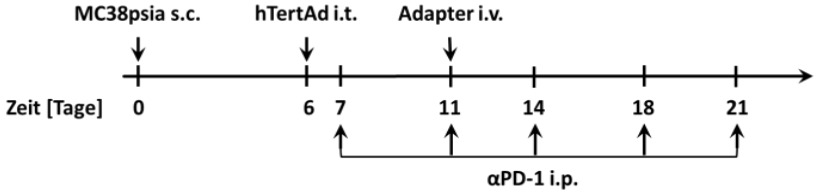


Abbildung 3.41: Integration der PD-1 Immuncheckpointblockade in das Behandlungsschema der Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie

Subkutane Tumore wurden durch Injektion von 1×10^7 MC38pSia-Zellen in naiven Mäuse etabliert und an Tag

sechs mit 1×10^9 ifu hTertAd i.t. behandelt. PD-1 Blockade erfolgte darauf an Tag 7, 11, 14, 18 und 21 nach Tumordinokulation durch i.p. Injektion eines α PD-1 Antikörpers. Adaptertherapie erfolgte an Tag 11 nach Zellinjektion durch i.v. Gabe von 50 μ g Adapterprotein (DE1scFvpSia).

Das Tumorstadium und das Überleben wurden dokumentiert und mit zuvor erhaltenen Daten nach der Sequenztherapie allein (Virotherapie gefolgt von Adaptertherapie) sowie ohne Therapie (0,9 % NaCl i.t.) verglichen (Abbildung 3.42).

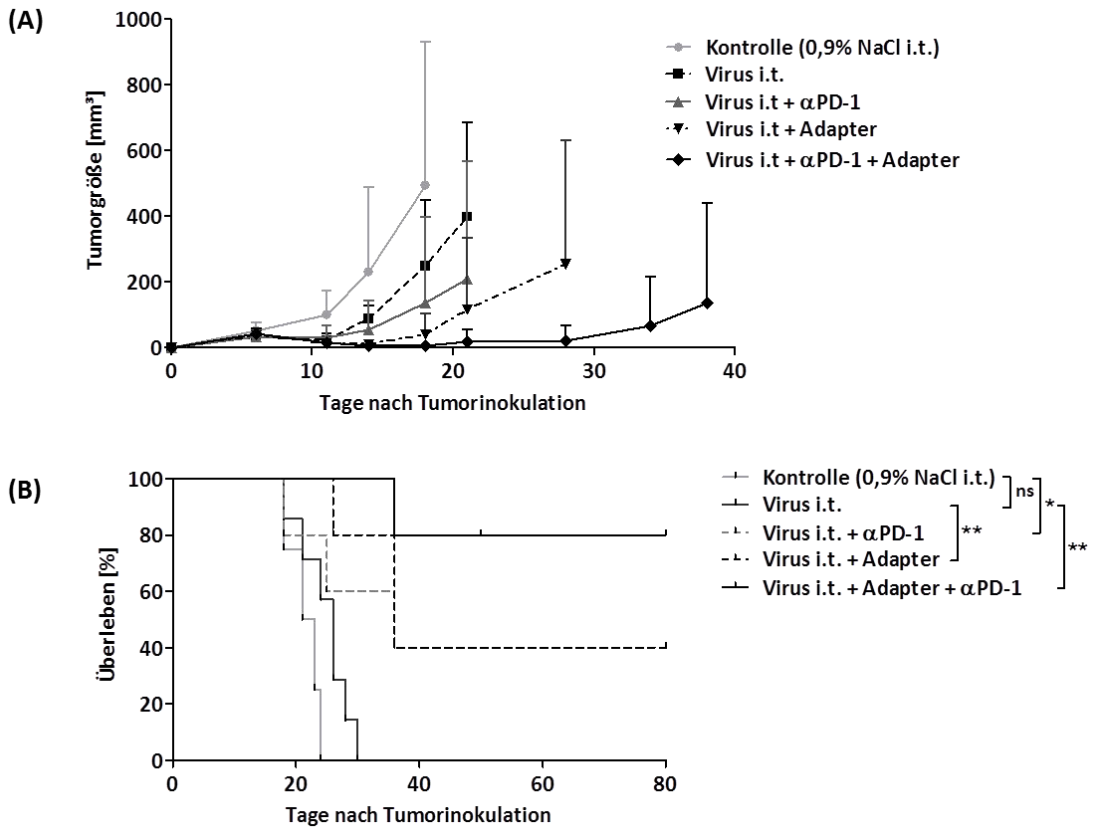


Abbildung 3.42: PD-1 Immuncheckpointinhibition und Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem Antikörper-Retargeting haben eine synergistische anti-tumorale Wirkung

Der Versuch wurde wie in Abbildung 3.41 beschrieben durchgeführt. Tiere erhielten Virus i.t. (n=7), Virus i.t. + α PD-1 (n=5), Virus i.t. + Adapter (n=5; Daten bereits unter Abbildung 3.28 gezeigt), Virus i.t. + Adapter + α PD-1 (n=5) oder wurden nicht behandelt (0,9 % NaCl i.t.; n=4; Daten ebenfalls aus Abbildung 3.28). Das Wachstum der Tumore (A) sowie das Überleben der Individuen (B) (Abbruchkriterien siehe 5.7.11) wurde dokumentiert. (Der letzte definierte Messpunkt der einzelnen Tumorstadiumskurven repräsentiert den letzten Messpunkt, an dem alle Tiere der jeweiligen Gruppe noch lebten). Mittleres Überleben in Tagen: Kontrolle: 22; Virus i.t.: 27; Virus i.t. + α PD-1: 36; Virus i.t. + Adapter: 36; Virus i.t. + Adapter + α PD-1: nicht definiert. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Im Verlauf des Versuchs zeigte sich wie zuvor beobachtet eine Wachstumsverzögerung nach intratumoraler Virusinjektion, die zu einem geringfügig längeren Überleben von 5 Tagen führte (27 Tage im Vergleich zu 22 Tagen in der Kontrollgruppe). Zusätzliche α PD-1 Therapie resultierte in keinem signifikant verlängerten mittleren Überleben, trotz einer Steigerung auf 36 Tage, gegenüber alleiniger Virotherapie. Es ließ sich jedoch in zwei von fünf der behandelten Tiere eine vollständige Tumorremission beobachten, ohne erneute Tumorprogression bis zum Versuchsende an Tag 80. Der Therapieerfolg scheint daher vergleichbar mit dem nach der Sequenztherapie aus Adapter-unterstützter Virotherapie (siehe Abbildung 3.28), hier lag das mittlere Überleben ebenfalls bei 36 Tagen und zwei von fünf der Tumore verschwanden vollständig. Im Gegensatz zur α PD-1-unterstützten Virotherapie führte die adapter-unterstützte Virotherapie jedoch anfänglich zu einer ausgeprägteren Verzögerung des Tumorwachstums, wodurch hier im Vergleich zu Virotherapie allein das Überleben statistisch signifikant verlängert wurde (vgl. Abbildung 3.28). Virotherapie gefolgt von Immuncheckpointblockade erzielte allerdings ein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zu unbehandelten Tieren, dies gelang durch Virotherapie allein nicht. Eine bemerkenswerte anti-tumorale Wirkung konnte letztendlich durch die gezielte Kombination der entwickelten Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie und Immuncheckpointinhibition erzielt werden. Initiale Virotherapie gefolgt von Adapterbehandlung und PD-1-Blockade führte zu einer sehr starken Inhibition des Tumorwachstums und resultierte in einem tumorfreien Langzeitüberleben bei vier von fünf Mäusen.

Diese Daten zeigen, dass durch eine gezieltes *Retargeting* virus-spezifischer Antikörper nach onkolytischer Virotherapie und der Amplifikation getriggelter anti-tumoraler T-Zellantworten durch unterstützende Immuncheckpointblockade eine äußerst wirksame Tumormimmuntherapie möglich ist.

4 Diskussion

Durch die Entwicklung verschiedener Tumorimmuntherapien innerhalb der letzten Jahrzehnte wurde die Rolle des Immunsystems als wichtiger Faktor für eine wirksame Tumorthherapie deutlich. Während klassische Therapieansätze wie Chemo- oder Radiotherapie hauptsächlich die direkte Zerstörung malignen Gewebes als Ziel verfolgen, soll im Rahmen von neuen Tumorimmuntherapien eine effektive Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor erfolgen. Entsprechende Therapiekonzepte beinhalten unter anderem die Behandlung mit immunmodulierenden Molekülen, wie zum Beispiel Interleukin 2, die durch eine immunaktivierende Wirkung die Induktion anti-tumoraler Immunität fördern (Rosenberg et al., 1998). Andererseits kann durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (mAbs) gegen spezifische Strukturen auf der Tumorzelloberfläche eine effektive und gezielte Aktivierung von Immuneffektormechanismen gegen Tumorzellen induziert werden. Hierbei können sowohl Faktoren des Komplementsystems als auch Immunzellen, wie zum Beispiel NK-Zellen gegen Tumorzellen aktiviert werden (Gennari et al., 2004; Hsu et al., 2010). Eine weitere Form monoklonaler Antikörper ermöglicht die Überwindung Tumor-induzierter Immunsuppression durch Blockierung inhibitorischer Signale während der T-Zellaktivierung. Diese Immuncheckpointinhibitoren können effizient die Induktion Tumorgerichteter T-Zellantworten fördern bzw. anti-tumorale T-Zellantworten reaktivieren und selbst im fortgeschrittenen Stadium maligner Erkrankungen noch substantielle Therapieerfolge erzielen, einschließlich vollständiger Ausheilung (Hodi et al., 2010; Schadendorf et al., 2015). Eine weitere innovative Immuntherapie stellen Tumor-selektiv infizierende bzw. replizierende onkolytische Viren dar. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene rekombinante onkolytische Viren etabliert, deren sichere Anwendbarkeit, hohe Tumorselektivität und therapeutische Effizienz inzwischen in klinische Studien bestätigen werden konnte (Andtbacka et al., 2015; Senzer et al., 2009). Heutzutage weiß man, dass neben der Triggerung einer starken anti-viralen Immunantwort in Folge der onkolytischen Infektion auch eine bystander-Induktion anti-tumoraler Immunreaktionen erfolgt, die maßgeblich an der therapeutischen Effizienz dieser Viren beteiligt ist (Diaz et al., 2007; Li et al., 2017). Die in Folge der viralen Infektion entstehenden zellulären sowie humoralen Immunantworten gegen das Virus behindern hierbei jedoch eine vollständige Infektion des Tumors. Zudem limitieren sie maßgeblich die Effektivität einer wiederholten Applikation des gleichen Vektors (Yang et al., 1995). Eine weitere Hürde bildet auch die hohe Seroprävalenz gegenüber vielen der gängigen onkolytischen Vektoren, wie beispielsweise humanen Adenoviren (Chirmule et al., 1999; Nwanegbo et al., 2004), die auch die Wirksamkeit der initialen Therapie vermindern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmalig eine humorale anti-virale Immunantwort, wie sie beispielsweise durch eine frühere Infektion oder durch eine

onkolytische Virotherapie induziert wird, für die Tumorthherapie nutzbar gemacht werden. Es ist davon auszugehen, dass anti-virale Antikörper einen hohen Reifungsgrad und ein geeignetes Subklassenspektrum haben, um eine virale Infektion hocheffektiv bekämpfen zu können. Eine Umlenkung anti-adenoviraler Antikörper gegen die Oberfläche maligner Zellen könnte daher zur Aktivierung Antikörper-vermittelter Effektormechanismen des Immunsystems führen und einen anti-tumoralen Effekt induzieren. Ein molekulares *Retargeting* anti-viraler Antikörper gegen eine Tumorspezifische Zielstruktur stellt einen neuen innovativen Ansatz zur gezielten Therapie von Tumorerkrankungen dar. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein bispezifisches Adapterprotein verwendet, das in der Lage ist, anti-adenovirale Antikörper zu binden und deren Umlenkung gegen eine Tumor-selektive Zelloberflächenstruktur ermöglicht. Die Mechanistik und die therapeutische Relevanz eines solchen Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings* wurde *in vivo* in verschiedenen Tumormodellen im Rahmen einer Monotherapie sowie im Kontext weiterer Immuntherapien, wie onkolytischer Virotherapie und Immuncheckpointblockade untersucht.

4.1 Die Auswahl eines geeigneten Antikörper-bindenden Liganden für ein bispezifisches Adapterprotein

Im Rahmen eigener Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde ein bispezifisches Adapterprotein zum *Retargeting* anti-adenoviraler Antikörper gegen eine Tumor-selektive Zielstruktur durch Fusion der Adenovirus 5 Hexon DE1-Domäne an ein *single chain Fragment* (scFv) gegen PolySia (aus dem monoklonalen Antikörper 735 (Frosch et al., 1985)) kloniert (eigene Masterarbeit: Etablierung eines molekularen Adapters zum *Retargeting* humoraler, virusspezifischer Immunreaktionen gegen solide Tumore, 2013, Technische Universität Braunschweig). Die Hexon-DE1 Domäne befindet sich innerhalb der exponierten Bereiche des Haupthüllproteins Hexon (Rux et al., 2003) und ist daher auf der Oberfläche des viralen Kapsids für anti-virale Antikörper zugänglich. Im Rahmen der Vorarbeiten konnte eine Bindung anti-adenoviraler IgGs sowohl an die singuläre DE1-Domäne als auch im Kontext des generierten Adapters gezeigt werden. Die im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation erfolgten Analysen zur Quantifizierung der DE1-spezifischen anti-adenoviralen Antikörperantwort zeigen, dass ca. 1/4 bis 1/5 der virus-gerichteten IgGs im Serum Ad5-immunisierter Mäuse DE1-spezifisch sind (Abbildung 3.1.). Eine Verknüpfung der DE1-Domäne mit anderen Antikörper-bindenden Domänen könnte die Bindung eines noch höheren Anteils an Antikörpern ermöglichen. Weitere dominante Ziele der anti-adenoviralen Antikörperantwort liegen beispielsweise im Fiber- und Pentonprotein des Virus (Gahery-Segard et al., 1998). Jedoch konnten Vorversuche zeigen, dass durch eine Verlängerung der Proteinsequenz die quantitative Aufreinigung der Proteine erschwert wird. Zudem zeigen die weiterführende Analysen, dass die DE1-Domäne sich ohne Funktionsverlust in ein bispezifische Protein

integrieren lässt und daher im Rahmen des Adapters dennoch mit ca. $\frac{1}{4}$ der gesamten Virus-spezifischen IgGs eine substantielle Antikörpermenge gebunden wird (Abbildung 3.2). Die einzelnen IgG-Subklassen, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (im humanen entsprechend IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) verfügen über unterschiedliche Potenziale, nach der Bindung ihrer jeweiligen Zielstruktur verschiedene Effektormechanismen zu induzieren. Murine IgG1, IgG2a und IgG2b sind unter anderem in der Lage über die Interaktion des Immunglobulin-Fc-Teils mit Rezeptoren auf Natürlichen Killer (NK) Zellen (Lanier et al., 1988) oder Makrophagen (Diamond and Scharff, 1980) zu interagieren und somit ADCC (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität) bzw. ADCP (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Phagozytose) Mechanismen zu induzieren. Zudem ist murines IgG2a ein potenter Aktivator des klassischen sowie alternativen Wegs der Komplementaktivierung und kann daher auch CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität) Mechanismen aktivieren (Klaus et al., 1979). Als dominante Subklasse, die in Folge einer Infektion mit Ad5 insbesondere gegen das Ad5 Hexon gerichtet ist, stellt IgG2a dar (Gahéry-Ségard et al., 1997). Detailliertere ELISA-Analysen der Adapter-erkennenden IgG-Subklassen zeigen, dass ein substantieller Anteil der virus-spezifischen IgG2a sowie IgG1 Antikörperantwort gegen die DE1-Domäne gerichtet ist (Abbildung 3.3). Diese *in vitro* Daten zeigen, dass das Adapterprotein nach Bindung an die Zielstruktur auf der Tumorzelloberfläche über gebundene IgG1 und IgG2a theoretisch dazu in der Lage ist *in vivo* CDC sowie ADCC Mechanismen zu induzieren. *In vitro* Versuche zur Komplementaktivierung gegen gebundene Tumorzellen durch den Adapter lieferten jedoch keine Anhaltspunkt für eine Komplementaktivierung (3.1). Es ist bekannt, dass für eine Komplementaktivierung eine relativ hohe Antikörperdichte sowie ein passender Abstand zwischen den IgG-Molekülen notwendig sind (Diebold et al., 2014; Valim and Lachmann, 1991). Dies wird möglicherweise im Rahmen der Adapter-gebundenen IgGs nicht erreicht. Zudem weisen die *in vivo* Studien auf eine vorwiegend zellulär-basierte Immunaktivierung in Folge der Adaptergabe hin (siehe: 3.3.)

4.2 Auswahl geeigneter Tumor-spezifischer Liganden für ein bispezifisches Adapterprotein

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Tumor-spezifisches *Retargeting* durch Verwendung Tumor-spezifischer Liganden gegen Polysialinsäure (PolySia) und humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA) ermöglicht. Die selektive Bindung und hohe Affinität des verwendeten Antikörperfragments gegen PolySia im Adapter DE1scFvpSia konnte bereits im Kontext eines anderen bispezifischen Adapterproteins zum *Retargeting* von Adenoviren auf die Zelloberfläche PolySia-positiver Zellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Kloos et al., 2015). Die selektive Bindung des scFv-Fragmentes im Rahmen des Adapters DE1scFvpSia wurde durch FACS-Analysen mit PolySia-positiven Tumorzelllinien untersucht (Abbildung 3.4). Hierfür wurden PolySia-exprimierenden humane Lungenkarzinom-, Rhabdomyosarkom- bzw. Neuroblastomzellen (H146, TE671 bzw. IMR32) als Kontrollen verwendet. Die FACS-Analysen zeigen,

dass diese Zellen selektiv und in ähnlichem Maße wie der Kontrollantikörper (mAb735 aus dem das scFv-Fragment des Adapters stammt) durch das Adapterprotein erkannt werden, während humane PolySia-negative Zellen (Panc01-Zellen) nicht gebunden werden. Um im Anschluss in immunkompetenten Mausmodellen mit syngenem Tumoren arbeiten zu können, ist die Verwendung muriner PolySia-exprimierender Tumorzellen notwendig. Da die geläufigen murinen Tumorzellen die für syngene Transplantationsmodelle zur Untersuchung von Immuntherapien genutzt werden kein PolySia exprimieren, erfolgte die Verwendung etablierter muriner Zelllinien, die in Folge retroviraler Transduktion mit der murinen Polysialyltransferase IV (PST IV) PolySia in vergleichbarem Maße wie humane Zellen exprimieren (Abbildung 3.4). Zur Analyse wurde hierbei die bereits zuvor beschriebene murine Lungenkarzinomzelllinie CMTpSia (Kloos et al., 2015) auf eine spezifische Adapterbindung hin untersucht. Zudem wurden die murinen Tumorzelllinien MC38 (Kolonkarzinom) und B16F10 (Melanom) zur stabilen PolySia-Expression retroviral transduziert und die Adapterbindung an diese Zellen validiert. CMT64, MC38 und B16F10 stellen gut charakterisierte murine Zelllinien für die Analysen von Tumormimmuntherapien dar, für die unter anderem die T-Zell-Neoepitopspektren ermittelt wurden (Castle et al., 2012; Woller et al., 2015; Yadav et al., 2014), wodurch Analysen Tumorantigen-spezifischer T-Zellantworten möglich sind. Als weitere Tumor-spezifische Zielstruktur eignet sich hCEA. CEA ist ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Glykoprotein, welches an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist (Benchimol et al. 1989). Es wird während der embryonalen Entwicklung gebildet, während es im adulten Organismus nur gering exprimiert wird. Erneute, hohe CEA-Reexpression erfolgt jedoch in verschiedenen malignen Tumoren, wie dem Mammakarzinom, dem Lungenkarzinom (SCLC sowie NSCLC) und dem Kolonkarzinom (Blumenthal et al., 2007; Kim et al., 1992). Im Rahmen der Arbeit wurde als CEA-bindender Ligand eines zweiten Adapterproteins ein anti-hCEA scFv aus dem monoklonalen Antikörper BW431/26 verwendet. Das scFv-Fragmente wurde bereits erfolgreich für die Entwicklung eines chimären T-Zellrezeptors eingesetzt (Hombach et al., 1999). Um im immunkompetenten murinen Tumormodell mit syngemem Tumorstadium arbeiten zu können, ist die Expression von humanem CEA in murinen Tumorzellen aufgrund der humanen Spezifität des Antikörperfragments notwendig. In Folge der retroviralen Transduktion mit dem hCEA (CEACAM5) wurde die Expression von hCEA durch die murine Kolonkarzinomzelllinie MC38 gewährleistet. Die hCEA-Expression wurde durch einen Kontrollantikörper (anti-CEACAM5/CD66e) nachgewiesen (Abbildung 3.12). FACS-Analysen bestätigten, dass eine selektive Bindung der murinen PolySia-positiven Tumorzellen MC38pSia, B16F10pSia und CMTpSia Zellen sowie die Bindung der MC38hCEA Zellen durch die entsprechenden Adapterproteine DE1scFvpSia und DE1scFvhCEA erfolgt (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.12.). Diese Zellen eignen sich daher, um die Wirkung eines Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings in vivo* in murinen syngenem Tumormodellen untersuchen zu können.

4.3 Untersuchungen zum therapeutischen Potential des Adapter-vermittelten Antikörper

Retargetings in vivo

Ein Vorversuch in meiner Masterarbeit konnte in einem Tumormodell mit intrinsischer Expression des Adapters DE1scFvpSia bzw. der DE1-Domäne ohne *Retargeting*-Domäne zeigen, dass die Sezernierung des Adapters durch den Tumor einen Wachstums-inhibierenden Effekt hat (Abbildung 3.5). Es wurde dadurch nachgewiesen, dass sowohl die Lokalisierung der DE1-Domäne auf der Tumorzelloberfläche (durch die anti-PolySia Domäne) als auch die Existenz anti-adenoviraler Antikörper (in Ad5-immunisierten Mäusen) für die anti-tumorale Wirkung essentiell sind. Die Expression des Adapters durch die Tumorzellen ermöglicht jedoch keine Aussage hinsichtlich der therapeutischen Effektivität des Adapters im Rahmen einer Tumorthherapie. Zur Entwicklung eines geeigneten therapeutischen Ansatzes wurde nachfolgend die Wirksamkeit des Adapters im Kontext verschiedener Applikationsrouten untersucht. Die Effizienz der Behandlung sowie die Induktion ungewollter Begleiterscheinungen variiert zum Teil maßgeblich zwischen verschiedenen Wegen der Applikation. Bei der Applikation eines therapeutischen Antikörpers zur gezielten Aktivierung von T-Zellen gegen ein Melanom-spezifisches Antigen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine lokale Applikation gegenüber einer systemischen keinen Einfluss auf die Effizienz der Therapie hat, jedoch deutlich weniger toxisch wirkt (Deppisch et al., 2015). Im Rahmen der Arbeit wurde diesbezüglich die intratumorale Injektion des aufgereinigten Adapters mit einer systemischen Applikation (intravenös) hinsichtlich der anti-tumoralen Wirkung, sowie Induktion ungewollter Nebenwirkungen in Ad5-immunisierten CMTpSia-tragenden Mäusen evaluiert. Die DE1-Domäne des Adapters repräsentiert als Protein viralen Ursprungs wahrscheinlich ein hoch-potentes Antigen und könnte in immunisierten Mäusen massive, akute Immunreaktionen hervorrufen. Insbesondere im Rahmen einer systemischen Administration sind beispielsweise spontane hohe Zytokinausschüttungen denkbar („Zytokinsturm“), die im Ernstfall dramatische Konsequenzen bis hin zum Tod haben können. Im Rahmen einer Phase I Studie mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD28, reagierten Patienten auf die systemische Applikation mit einer systemischen Entzündungsreaktion, hohem Fieber und zum Teil Organversagen (Suntharalingam et al., 2006). Dementsprechend erfolgte eine genaue Kontrolle der hier behandelten Individuen, bei der auf verändertes Verhalten der Tiere geachtet wurde. Dazu zählen deutlich verminderte oder erhöhte Aktivität oder Separierung von den anderen Tieren der Gruppe. Sowohl in Folge der i.v. als auch der i.t. Behandlung konnten jedoch keine Anzeichen akuter Toxizität beobachtet werden. Das Verhalten der therapierten Individuen entsprach dabei dem der Tiere die eine Mock-Injektion erhielten. Leichte Nebenwirkung, die am Verhalten der Tiere nicht unmittelbar erkennbar sind, können jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Es lassen sich aber zumindest schwere Nebenwirkungen im hier untersuchten murinen Modell

ausschließen. Unterschiede in der Effektivität der Behandlung zeigen sich jedoch in Abhängigkeit des Administrationsweges (Abbildung 3.6). Eine intratumorale Injektion des Adapters resultiert in einem nicht messbar veränderten Tumorwachstum im Vergleich zu Kontrolltieren die das funktionslose DE1-Protein erhielten. Im Gegensatz dazu führt die intravenöse Gabe zu einem deutlich verzögerten Tumorwachstum. Die Überlegenheit einer systemischen Applikation gegenüber der lokalen Injektion ist möglicherweise durch eine vermehrte Bindung anti-adenoviraler Antikörper an das Adapterprotein vor Kontakt zur Zielzelle und die dadurch effizientere Induktion von Effektormechanismen zu erklären. Eine mögliche Erklärung für die geringe Effizienz der intratumoralen Therapie könnte zudem durch den onkotischen Druck im Tumor zu erklären sein. Hierbei kommt es zu einem druckbedingten Flüssigkeitsstrom aus dem Tumor, durch den ein schneller Abtransport und Verlust des injizierten Adapters in die benachbarten lymphatischen Gewebe erfolgt (Zur Übersicht siehe: Swartz & Lund, 2012). Ein großer Vorteil einer systemischen Therapie ist zudem die Möglichkeit disseminierte Erkrankungen mit Mikrometastasen sowie schwer erreichbare Tumore behandeln zu können. Die Wirksamkeit einer intravenösen Adapterapplikation hinsichtlich einer deutlichen Tumorwachstumsinhibition und signifikant verlängertem Überleben ließ sich in allen drei untersuchten Tumormodellen bestätigen (CMTpSia, MC38pSia, B16F10pSia) (Abbildung 3.8). Die Untersuchungen zur therapeutischen Effektivität des Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargeting* wurden hierbei jeweils in geringem Abstand zur Immunisierung durchgeführt. Im Rahmen einer klinischen Anwendung würde dies beispielsweise die Situation nach einer vorgeschalteten onkolytischen Virotherapie widerspiegeln oder einer akuten adenoviralen Infektion. Die hohe Seroprävalenz gegenüber Adenovirus 5 in Patienten (Chirmule et al., 1999; Nwanegbo et al., 2004) könnte jedoch eine Adapter-basierte Therapie allgemein ermöglichen. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, ob auch in längerem Abstand zur Immunisierung ein Antikörper-*Retargeting* noch therapeutische Wirksamkeit zeigt. Hierbei könnte der über die Zeit abfallende Antikörpertiter im Blutserum einen limitierenden Faktor darstellen. Diese Situation wurde durch die Therapie subkutaner MC38pSia-Tumore in Ad5-immunisierten Mäusen acht Wochen nach der Infektion simuliert (Abbildung 3.9). Die Ergebnisse bestätigen, dass eine wirksame anti-tumorale Therapie auch in längerem Abstand zur Infektion möglich ist und ein Adapter-vermitteltes Antikörper-*Retargeting* sowohl zu einer Tumorwachstumsinhibition als auch zu einem signifikant verlängerten Überleben führt. Die Überlebensverlängerung war allerdings weniger ausgeprägt als im Rahmen der Therapie in geringem Abstand zur Immunisierung (vgl. Abbildung 3.8). Neben dem Abfall des Antikörpertiters, der insbesondere hinsichtlich der Lebensspanne im Menschen eine größere Rolle spielen könnte, kommt im hier untersuchten murinen Modell auch das Alter der Mäuse zum Therapiezeitpunkt als limitierender Faktor in Frage. Beispielsweise kann die Fähigkeit zur Induktion von Effektor T-Zellen in älteren Mäusen vermindert sein und die Wirksamkeit anti-tumoraler Therapien

limitieren (Ruby and Weinberg, 2009). Um sowohl den Einfluss des Alters als auch des Antikörpertiters auf die therapeutische Wirksamkeit der Adaptertherapie näher zu bestimmen, könnte in weiterführenden Experimenten ein additiver Transfer von Serum Ad5-immunisierter Individuen in naive Mäuse vor der Adapterapplikation erfolgen. Hierbei könnte sowohl der Einfluss des Antikörpertiters als auch die Bedeutung des Alters genauer untersucht werden.

4.3.1 Allgemeine Einsetzbarkeit des Antikörper-*Retargetings* auf eine alternative

Zielstruktur

Im Rahmen der Arbeit wurde vorwiegend das Antikörper-*Retargeting* gegen PolySia als Tumorspezifische Struktur untersucht. Die Übertragbarkeit des Therapieprinzips auf alternative Zielstrukturen ist eine essentielle Anforderung, um die Belastbarkeit des Antikörper-*Retargetings* als Therapiekonzept zu überprüfen. Hierzu erfolgte die Generierung eines zweiten Adapters mit einem scFv gegen humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA) (Abbildung 3.12). ELISA-Daten mit Serum naiver und Ad5-immunisierter Mäuse bestätigen die Funktionalität der DE1-Domäne zur Bindung anti-adenoviraler Antikörper im Kontext des zweiten Adapters (Abbildung 3.12) und das zumindest der Austausch gegen strukturell ähnliche Tumor-Liganden ohne Funktionsverlust der DE1-Domäne möglich ist. Intravenöse Applikation des Adapters DE1scFvhCEA resultiert zudem in einer Wachstumsinhibition hCEA-exprimierender MC38hCEA-Subkutantumore in immunisierten Mäusen und führt zu einem signifikant verlängerten Überleben (Abbildung 3.13). Im Vergleich zu den Daten im PolySia-Modell (Abbildung 3.8) wird jedoch im Kontext des hCEA-Modells eine etwas schwächere therapeutische Effektivität im Hinblick auf das Ausmaß der Wachstumsverzögerung und Überlebensverlängerung erreicht. Dies könnte durch die vergleichsweise geringere Affinität des Antikörpers BW431/26 gegen CEA mit 9 nM (Bosslet et al., 1988) im Vergleich zu 5 nM des anti-PolySia Antikörpers 735 zu erklären sein (Häyrynen et al., 2002). Zudem erscheint die Antigenexpression des hCEA im Vergleich zu PolySia auf der Zelloberfläche deutlich geringer zu sein (vgl. Abbildung 3.4 und Abbildung 3.12). Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass das therapeutische Konzept allgemein auf eine alternative Zielstruktur übertragbar ist und auch im Kontext schwächerer Tumor-Adapter-Interaktion noch therapeutische Wirksamkeit zeigt.

4.3.2 Therapeutische Wirksamkeit im autochthonen Tumormodell der Leber

Tumorthérapien können in Modellen mit transplantierten Tumoren eine deutlich stärkere Wirksamkeit aufweisen, als natürlich *in situ* entstandene Tumore (Bourquin et al., 2010), da der Einfluss eines natürlichen Tumor-umgebenden Mikromilieus unterrepräsentiert ist. Im Rahmen des Leberkarzinoms spielen beispielsweise dysfunktionale dendritische Zellen, mit vermindertem Potenzial zur Antigenpräsentation (Ninomiya et al., 1999) und immunsuppressive Immunzellen wie myeloide

Suppressorzellen (Hoechst et al., 2008) und regulatorische T-Zellen (Kobayashi et al., 2007) eine wesentliche Rolle. Um die Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* in einem Modell zu verifizieren, dass die klinische Situation besser widerspiegelt, erfolgte die Untersuchung in einem transgenen Modell eines singulären PolySia-exprimierenden Lebertumors (Abbildung 3.10). Durch das definierte genetische Setup des induzierten Lebertumors zeichnet dieser sich zudem durch eine vergleichsweise geringe Mutationsrate und geringere Immunogenität im Vergleich zu den zuvor verwendeten subkutanen Tumormodellen aus. Die Wirksamkeit der Adaptertherapie konnte auch in diesem aggressiv wachsenden und vergleichsweise schwach immunogenen Tumormodell bestätigt werden. Die Therapie resultiert hierbei in einer signifikanten Überlebensverlängerung behandelter Individuen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 3.11). Hiermit konnte die Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* auch in einem Modell verifiziert werden, dass die Anforderungen für einen späteren klinischen Einsatz besser abbildet.

4.4 Untersuchungen zu den immunologischen Wirkmechanismen der Adaptertherapie

4.4.1 Einfluss der Adaptertherapie auf das Tumormikromilieu

Die Konversion eines immunsuppressiven Tumormikromilieus (TME) hin zu einem immunaktivierenden Phänotyp ist ein Hauptziel der Tumorimmuntherapie. Einen ersten Hinweis auf das Potenzial der entwickelten Adaptertherapie, die Immunkontextur des Tumors zu beeinflussen, lieferten Analysen der tumorinfiltrierenden Immunzellen in das Tumorgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn (3.3.1). In der frühen Phase der Therapie zeigt sich, dass es zunächst zu einer Rekrutierung konventioneller NK-Zellen in den Tumor kommt (Abbildung 3.16). NK-Zellen gehören zu den zytotoxischen Effektorzellen und können neben der direkten Zelllyse auch maßgeblich an der Aktivierung anderer Immunzellen beteiligt sein. Durch die Ausschüttung von Zytokinen, wie Interferon gamma (IFN γ) können diese beispielsweise die Stimulation und Reifung von dendritischen Zellen (DCs) entscheidend fördern (Mocikat et al., 2003) und eine Kreuzpräsentation von Tumorantigenen, die durch NK-Zell-vermittelte Tumorzelllyse frei werden, deutlich verstärken. Es konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass DCs in Anwesenheit von NK-Zellen wesentlich effektiver beim Priming von Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellen sind (Tosi et al., 2004). Eine Antikörper-vermittelte Aktivierung einer entsprechenden NK-Zell-abhängigen Immunkaskade konnte am Beispiel des monoklonalen mAb Cetuximab gezeigt werden (Srivastava et al., 2013). Die Infiltration von NK-Zellen in das Tumorgewebe nach Adaptergabe ist daher ein erster Hinweis für eine immunologische Aktivierung. Die nachgewiesene Bindung von IgG1 und IgG2a Antikörpern an den Adapter und die damit denkbare ‚Pseudo-Opsonisierung‘ der Tumorzellen, könnte zudem zu einer direkten Rekrutierung und Aktivierung von Phagozyten, wie zum Beispiel Makrophagen führen (Gül et al., 2014). Die Tumorinfiltration mit

aktivierten Makrophagen, identifiziert durch einen CD11b- und Gr1-positiven Phänotyp mit hohem F4/80-Expressionslevel, wird jedoch durch die Adaptertherapie zunächst nicht beeinflusst (Abbildung 3.17). Dies lässt vermuten, dass eine unmittelbare Induktion von ADCP (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Phagozytose) durch Makrophagen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Zum frühen Zeitpunkt werden auch die tumorinfiltrierenden Myeloiden Suppressor Zellen (MDSCs) sowie CD4 und CD8 T-Zellen kaum beeinflusst (Abbildung 3.17 bzw. Abbildung 3.18). Da T-Zellen jedoch zum adaptiven Immunsystem zählen, war eine Veränderung dieser Zellpopulationen direkt nach Therapieinitiation nicht zu erwarten.

Im weiteren Verlauf der Therapie normalisiert sich das NK-Zell-Niveau (Abbildung 3.19.) und es kommt zu einer Abnahme an reifen Makrophagen im Tumorgewebe (Abbildung 3.20). Diese Abnahme könnte als Folge der phagozytotischen Aktivität dieser Zellen im Rahmen der Beseitigung toter Zellen im Tumorgewebe zu erklären sein. Makrophagen gehören zu den klassischen phagozytierenden Zellen und können daher apoptotische Zellen aufnehmen und abbauen (Zur Übersicht siehe: Erwig and Henson, 2008). In Folge dieses Prozesses kann es auch zu einer Abwanderung der Makrophagen aus dem Gewebe und deren Absterben kommen (Bellingan et al., 1996). Demnach könnte die Abnahme dieser Zellen im Tumor ein sekundärer Effekt der Therapie sein, der durch die Phagozytose toter Tumorzellen hervorgerufen wird. Interessant zu untersuchen wäre jedoch auch der Einfluss der Adaptertherapie auf die Polarisierung der tumorassoziierten Makrophagen, die in einen immunaktivierenden Subtyp (M1) und einen immunsuppressiven Subtyp (M2) unterteilt werden können und deren Verhältnis beispielsweise beim Ovarialkarzinom und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom als prognostischer Faktor dient (Mei et al., 2016; Zhang et al., 2014).

Zum späten Zeitpunkt während der Adaptertherapie tritt neben der Abnahme an Makrophagen eine deutliche Veränderung in den MDSC-Populationen ein (Abbildung 3.20). Hier lassen sich verschiedene Subpopulationen abgrenzen. Dolcetti et al haben zeigen können, dass insbesondere MDSCs mit einer mittleren und geringen Gr1-Expression (hier als P2 definiert) besonders immunsuppressive Eigenschaften aufweisen, während eine hohe Gr1-Expression (hier P1) auf eine Subpopulation mit kaum immunsuppressivem Potenzial hinweist (Dolcetti et al., 2010). Nach der Adaptertherapie erfolgt eine Zunahme der P1 Population und eine Reduktion der immunsuppressiven Population P2. Dolcetti et al. konnten sogar Hinweise liefern, dass sich die hier als P1 definierte Gr1^{high} positiv auf die Induktion Antigen-spezifischer CD8 T-Zellen auswirkt. Die erhöhte P1-Population im Tumor nach Therapie und die gleichzeitige Abnahme der P2 Population weist daher auf eine Tendenz in Richtung abnehmender Immunsuppression im Tumor hin. MDSCs können aktiv die Angiogenese des Tumors fördern (Sorrentino et al., 2015) und durch die Ausschüttung von Zytokinen die Rekrutierung anderer immunsuppressiver Zellen, wie regulatorische T-Zellen (Tregs) in das Tumorgewebe bewirken (Schlecker et al., 2012). Durch

die Ausschüttung von Stickoxiden können MDSCs sowohl die Bindung von CD8 T-Zellen an Peptid-beladene MHC I-Moleküle als auch die initiale Bindung prozessierter Peptide an MHC I auf der Tumorzelloberfläche inhibieren und so die Erkennung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) durch Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen verhindern (Lu et al., 2011; Nagaraj et al., 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass MDSCs neben der Inhibierung der T-Zell-Effektorfunktionen auch die Aktivität von NK-Zellen entscheidend hemmen können (Mao et al., 2014). Die Abnahme dieser immunsuppressiven Zellen in Folge der Adaptertherapie könnte daher die Aktivität von NK-Zellen sowie die Induktion Tumor-gerichteter T-Zellen positiv beeinflussen. Im Einklang mit der Annahme einer reduzierten Immunsuppression kommt es in Folge der Adaptertherapie zum späteren Zeitpunkt zu einem veränderten Verhältnis innerhalb der CD4 und CD8 T-Zellpopulationen im Tumorgewebe (Abbildung 3.21). Hierbei führt die Therapie einerseits zu einer relativen Abnahme an CD4-positiven Zellen. Innerhalb der CD4 T-Zellen finden sich verschiedene Subpopulationen, darunter einerseits Antigen-spezifische CD4 T-Helfer (Th) Zellen. Sowohl Th1- als auch zu einer geringeren Effizienz Th2-Zellen sind in der Lage *in vivo* sowohl CD8 T-Zell-abhängig (Nishimura et al., 1999) als auch unabhängig Tumorzellen zu eliminieren (Hung et al., 1998). CD4 positive Tregs hingegen können an der Immunsuppression im Tumor maßgeblich beteiligt sein und beispielsweise effizient die Effektorfunktionen anderer T-Zellen, darunter auch zytotoxischer CD8 T-Zellen entscheidend schwächen (Antony et al., 2005). Eine Rekrutierung von Tregs in das Tumorgewebe erfolgt dabei unter anderem durch tumorinfiltrierende MDSCs (Schlecker et al., 2012). Es wäre somit denkbar, dass es in Folge der Abnahme an MDSCs während der Adaptertherapie zu einer reduzierten Rekrutierung an Tregs in das Tumorgewebe kommt und somit die relative Abnahme an CD4 T-Zellen zu erklären ist. Dies muss jedoch durch nähere Charakterisierung der einzelnen CD4 T-Zell-Subtypen zukünftig untersucht werden und kann zu diesem Zeitpunkt lediglich vermutet werden. Hier wäre insbesondere die Quantifizierung der Tregs im Rahmen zukünftiger FACS Analysen durch Integration der Treg-Marker CD25 und Foxp3 (Fontenot et al., 2003) sinnvoll.

Neben der Abnahme an CD4 T-Zellen resultiert die Adaptertherapie zum späten Zeitpunkt in einer deutlich erhöhten Frequenz an CD8 T-Zellen (Abbildung 3.21). CD8 T-Zellen gehören wie die NK-Zellen zu den zytotoxischen Effektorzellen und können direkt maligne Zellen zerstören. Ein hoher Grad an CD8 T-Zellinfiltraten gilt bei der Mehrheit aller malignen Tumore als positiver prognostischer Faktor, darunter beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) (Wada et al., 1998), malignem Melanom (Clemente et al., 1996), Mammakarzinom (Mahmoud et al., 2011) und beim kolorektalen Karzinom (Galon et al., 2006; Noshó et al., 2011; Pagès et al., 2009). Als wichtiger prognostischer Faktor dient zudem das Verhältnis von CD8/CD4 T-Zellen (Diederichsen et al., 2003; Huang et al., 2015). Eine Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten von CD8 T-Zellen weist auf eine Verschiebung innerhalb des Tumormikromilieus von einem immunsuppressiven zu einem aktivierenden Phänotyp hin. Eine entsprechende Korrelation zwischen

einem positiven Therapieansprechen und einer Veränderung des CD8/CD4-Verhältnisses zu Gunsten von CD8 T-Zellen konnte beispielsweise beim Mammakarzinom gezeigt werden (García-Martínez et al., 2014). Die Adaptertherapie resultiert hinsichtlich des Verhältnisses an CD8/CD4 T-Zellen in einer klaren Verschiebung zu Gunsten der CD8 T-Zellen im späteren Verlauf der Therapie (Abbildung 3.21). Die erhöhte Frequenz an CD8 T-Zellen und die Zurückdrängung immunsuppressiver myeloider Zellen weist somit insgesamt auf eine effektive Konversion des Tumormikromilieus hin und ist neben der frühen Infiltration von NK-Zellen wahrscheinlich maßgeblich an der Adapterwirkung *in vivo* beteiligt.

4.4.2 Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten in Folge des Antikörper-Retargetings

Immuntherapien können langanhaltende anti-tumorale T-Zellantworten induzieren. Ein wesentlicher Faktor in der T-Zell-basierten anti-tumoralen Immunantwort ist hierbei die Erkennung von Tumorspezifischen Neoantigenen, die auf Mutationen in codierenden Sequenzen zurückzuführen sind, durch CD8 T Zellen (Lennerz et al., 2005). Diese können eine relativ hohe Affinität zu ihren Zielzellen aufweisen, da sie nicht der Thymusselektion unterliegen. Ihr Nutzen für eine gezielte Therapie ist jedoch limitiert, da sie für jeden Tumor individuell sind. In den letzten Jahren wurden Neoepitopspektren von verschiedenen etablierten Tumorzellen analysiert und auf immunogene Mutationen untersucht, dazu zählen unter anderem die Melanomzelllinie B16F10 (Castle et al., 2012), die Lungenkarzinomzelllinie CMT64 (Woller et al., 2015) und die in den immunologischen Analysen dieser Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinie MC38 (Yadav et al., 2014). Yadav et al. konnten unter anderem die drei immunogenen Neoepitope Adpgk, Repts1 und Dgagt1 identifizieren, wobei Adpgk ein besonders dominantes Epitop ist. Der Vergleich der Adpgk-spezifischen CD8 T-Zellantwort nach der Therapie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigt, dass es in Folge der Adaptertherapie zu einem signifikanten Anstieg Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen kommt (Abbildung 3.22). Einen Zusammenhang zwischen einer hohen Neoantigen-spezifischen T-Zellantwort und einem klinischen Ansprechen in Patienten ist bereits bekannt (Rizvi et al., 2015; Van Rooij et al., 2013). Auf eine therapeutische Relevanz deuten auch die besonders hohen Adpgk-Antwort in den Individuen mit vollständiger Tumorregression hin (Abbildung 3.40).

4.4.3 Untersuchungen zur Rolle von Makrophagen, NK-Zellen und CD8 T-Zellen an der therapeutischen Wirkung des Antikörper-Retargetings

Die funktionelle Beteiligung von Makrophagen, NK-Zellen und CD8 T-Zellen an der Adapter-vermittelten anti-tumoralen Wirkung *in vivo* wurde durch Depletionsexperimente untersucht (Abbildung 3.23). Obwohl Makrophagen im Verlauf der Therapie abnehmen (siehe oben), hat eine Depletion dieser Zellpopulation keinen Einfluss auf die Adapter-abhängige Wachstumsinhibition und

Überlebensverlängerung therapiertes Mäuse. Makrophagen üben daher mechanistisch keine wesentliche unterstützende Wirkung auf den anti-tumoralen Effekt des Antikörper-*Retargetings* aus. Die Depletion sowohl von NK-Zellen als auch CD8 T-Zellen hingegen resultiert in einer deutlichen Reduktion der therapeutischen Effektivität. Die jeweilige Depletion der einzelnen Subpopulationen führt bereits zu einem nahezu vollständigen Verlust der Wirksamkeit, während die Kodepletion beider Immunzelltypen den therapeutischen Effekt vollständig neutralisiert bzw. sogar in einem leicht beschleunigten Tumorwachstum und reduzierten Überleben der Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe resultiert. Dies weist daraufhin, dass möglicherweise bereits eine geringe natürliche (nicht Therapie-induzierte) Tumorstauungskontrolle durch diese Effektorzelltypen im hier untersuchten MC38pSia-Tumormodell erfolgt. Der Verlust der Adapter-vermittelten anti-tumoralen Wirkung im Kontext beider Monodepletionen weist jedoch auf eine mögliche Interaktion von NK-Zellen und CD8 T-Zellen hin. Es ist bekannt, dass NK-Zellen entscheidend zur Induktion Antigen-spezifischer T-Zellantworten beitragen können (Ge et al., 2012; Kos and Engleman, 1996; Liu et al., 2000). Dies ist im Einklang mit dem Befund, dass es im Rahmen der Antikörper-*Retargeting*-Therapie zu einer zeitlich versetzten Infiltration von NK-Zellen zum frühen Zeitpunkt und CD8 T-Zellen zum späteren Zeitpunkt kommt (vgl. Abbildung 3.16 und Abbildung 3.21). Um diese Abhängigkeit zu klären, wurde der Einfluss der NK-Zelldepletion während der Therapie auf die Entstehung Tumorantigen(Adpgk)-spezifischer CD8 T-Zellen untersucht. Die NK-Zelldepletion während der Therapie inhibiert die Adapter-vermittelte Triggerung Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen sehr effektiv (Abbildung 3.24). Dies bestätigt, dass eine Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in Folge der Adaptertherapie ein NK-Zell-abhängiger Prozess ist. In einem murinen Lymphommodell konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von IFN γ durch NK-Zellen zu einer Stimulierung von dendritischen Zellen führt und essentiell für die Induktion zytotoxischer Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen ist (Adam et al., 2005). Als weiterer Faktor setzen NK-Zellen durch Tumorzelllyse zusätzliche Tumorantigene frei, die durch Antigen-präsentierende Zellen im Anschluss präsentiert werden können. In diesem Zusammenhang wäre es interessant in weiterführenden Untersuchungen die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen im Tumorgewebe detaillierter zu analysieren.

4.5 Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit auf Metastasen

Ein individueller Vergleich von Tumoren verschiedener Größe zum Therapiebeginn (Abbildung 3.7) weist daraufhin, dass die Effektivität der Therapie bei kleineren Tumorknoten besonders hoch ist. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die Antikörper-*Retargeting* Therapie von Metastasen, insbesondere im frühen Stadium der Metastasierung, besonders effektiv wirkt. Die Quantifizierung der Tumormasse in einem Modell mit CMTpSia-Lungenkolonien zeigte, dass sowohl zu einem frühen Zeitpunkt

nach der Therapie als auch zu einem späteren Zeitpunkt eine hocheffektive Wachstumsinhibition der induzierten Lungenmetastasen in Folge der Adaptertherapie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erfolgt (Abbildung 3.26 bzw. Abbildung 3.27). Im Rahmen der Analysen zu den tumorinfiltrierenden Immunzellen in Folge des Antikörper-*Retargetings* konnte eine frühe Rekrutierung von NK-Zellen (auch in subkutanen CMTpSia Tumoren, Abbildung 3.25) gezeigt werden (Abbildung 3.16) und deren wichtige Funktion in der Stimulation Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen (Abbildung 3.22). NK-Zellen können maßgeblich an der Limitierung und Eliminierung von Metastasen beteiligt sein (Brodbeck et al., 2014; Ksienzyk et al., 2011). Zudem konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass durch eine Antikörper-vermittelte Stimulation der NK-Zellen mittels einer Blockade der inhibitorischen Interaktion von CD96 mit CD155 Lungenmetastasen nach intravenöser Tumorzellinjektion effektiv unterdrückt werden können (Blake et al., 2016). Die Adapter-vermittelte Rekrutierung von NK-Zellen könnte somit an der besonders effektiven Eliminierung von Metastasen entscheidend beteiligt sein. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte ein möglicher Anwendungsbereich des Antikörper-*Retargetings* die begleitende (adjuvante) Therapie zur Tumorresektion bilden. Dabei könnte die Adaptertherapie maßgeblich zur Limitierung des Auswachsens von Mikrometastasen bzw. eines Lokalrezidivs beitragen.

4.6 Therapeutische Konzepte zur gezielter Kombination des Adapter-vermittelten Antikörper-*Retargetings* mit weiteren Tumorimmuntherapien

4.6.1 Untersuchungen zur therapeutischen Effizienz einer Sequenztherapie aus initialer Virotherapie gefolgt von Antikörper-*Retargeting*

Das Antikörper-*Retargeting* ermöglicht die gezielte Umlenkung humoraler Immunantworten gegen Tumorzellen und deren effektive therapeutische Nutzung. Eine akute anti-virale Immunantwort, wie sie in Folge onkolytischer Virotherapie entsteht, bietet daher eine geeignete Basis für ein anschließendes Antikörper-*Retargeting*. Es ist bekannt, dass humane Adenoviren nur zu einem geringen Maß in der Lage sind in murinen Zellen zu propagieren (Blair et al., 1989). Heute weiß man, dass zwar eine Infektion erfolgt und die virale DNA sowohl repliziert als auch transkribiert wird, jedoch im Anschluss die Proteinsynthese der viralen Proteine nur ungenügend erfolgt und daher kaum infektiöse Partikel gebildet werden (Young et al., 2012). Daher ist der Grad an direkter Tumorzelllyse durch Propagation viraler Partikel in murinen Modellen limitiert. Im humanen System dürften die Auswirkungen der viralen Tumorzelllyse erheblich größer sein und können in einem murinen Modell nur bedingt abgebildet werden. Dennoch konnte nach i.t. Virusapplikation des onkolytischen Adenovirus 5 hTertAd (Wirth et al., 2003) in subkutane MC38pSia Tumore zunächst eine vorübergehende Tumorstillung im Vergleich zur Mock-therapierten Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 3.28). Diese ist jedoch nicht ausreichend, um das Überleben der therapierten Tiere signifikant zu verlängern. Die initiale

Tumorwachstumshemmung ist nicht nur auf die Lyse infizierter Zellen, sondern vermutlich auch auf die lokale Entzündungsreaktion zurückzuführen. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit im MC38pSia Tumormodell bestätigt werden (3.5.1). Die Daten der tumorinfiltrierenden Zellen drei Tage nach intratumoraler Virotherapie zeigen, dass es zunächst zu einer Infiltration von NK-Zellen in das Tumorgewebe kommt (Abbildung 3.30). Es ist bekannt, dass es in Folge der Behandlung mit onkolytischen Adenoviren aufgrund der Immunreaktion auf die virale Infektion zu einer starken Entzündungsreaktion im Gewebe kommt (Kleijn et al., 2014; Woller et al., 2011). Dies resultiert in einer Schwächung des immunsuppressiven Mikromilieus im Tumor und führt zur Infiltration von Immunzellen, wie NK-Zellen, CD8 und CD4 T-Zellen (Kleijn et al., 2017). Es ist bekannt, dass insbesondere NK-Zellen an der frühen Eliminierung infizierter Zellen in der Leber nach systemischer Applikation adenoviraler Vektoren beteiligt sind (Liu et al., 2000; Zhu et al., 2008). Dass NK-Zellen auch an der anti-tumoralen Wirkung onkolytischer Virotherapie beteiligt sein können, konnte beispielsweise im Rahmen der Therapie mit einem onkolytischen Vesikular Stomatitis Virus (VSV) in einem murinen Modell mit B16 Tumoren gezeigt werden (Diaz et al., 2007). Dabei führte eine Depletion von NK-Zellen während der Therapie zu einem vollständigen Verlust der Virotherapie-induzierten Tumorwachstumshemmung. Die Virotherapie mit hTertAd führt im hier untersuchten Modell jedoch nur zu einer zeitlich begrenzten NK-Zellinfiltration, die acht Tage nach der Infektion wieder auf Werte der Kontrollgruppe absinkt (Abbildung 3.33). Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch eine erhöhte Frequenz an CD8 T-Zellen sowie eine leicht höhere Frequenz an CD4 T-Zellen in virotherapierten Tumoren im Vergleich zur Mock-therapierten Gruppe zu beobachten (Abbildung 3.36). Eine wesentliche Beteiligung sowohl von CD4 als auch CD8 T-Zellen an der therapeutischen Wirkung onkolytischer Adenoviren konnte im murinen Modell des Glioblastoms gezeigt werden (Kleijn et al., 2017). Es ist bekannt, dass eine onkolytische Virotherapie neben der Induktion antiviraler T-Zellantworten auch tumor-spezifische T-Zellen triggert, die maßgeblich für die therapeutische Effektivität sind (Diaz et al., 2007; Li et al., 2017). In Folge der Virotherapie im hier verwendeten MC38pSia-Tumormodell erfolgt ebenfalls eine Triggerung Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen (Abbildung 3.37). Dies stimmt mit Befunden im CMT64-Tumormodell überein, auch hier erfolgte eine Triggerung Neoantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in Folge intratumoraler Therapie mit hTertAd (Woller et al., 2015). Die Daten im MC38pSia-Modell zeigen, dass es in Folge der Therapie zu einer erhöhten Frequenz Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen kommt, die jedoch nicht signifikant gegenüber der Mock-therapierten Kontrollgruppe erhöht ist. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Quantifizierung einer einzelnen Neoepitop-spezifischen T-Zellantwort nur einen Ausschnitt der gesamten Neoantigenom-spezifischen Immunantwort darstellt und bekannt ist, dass es nach der Virotherapie zusätzlich zu einem *Epitope-Spreading* kommt (Woller et al., 2015). Die Daten zeigen zusammenfassend, dass es in diesem Modell in Folge der Virotherapie zu einer vorübergehenden Aktivierung des

Tumormikromilieu kommt, dargestellt durch die Infiltration von NK-Zellen und nachfolgend der Infiltration von T-Zellen, sowie eine Triggerung Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen erfolgt. Dennoch fällt der therapeutische Effekt der Monotherapie eher moderat aus. Die Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem *Retargeting* induzierter anti-viraler Antikörper hingegen führt zu einer deutlich erhöhten therapeutischen Wirksamkeit (Abbildung 3.28). Dies weist auf eine synergistische anti-tumorale Wirkung beider Therapien nach gezielter Kombination hin. Analysen tumorinfiltrierender Zellen zeigen, dass das Adapter-basierte *Retargeting* Virotherapie-getriggelter Antikörper zu einer erneuten starken Infiltration von NK-Zellen führt (Abbildung 3.33). Zudem nimmt die Häufigkeit tumorinfiltrierender CD8 T-Zellen weiter zu (Abbildung 3.36), wodurch das Verhältnis an CD8 T- zu CD4 T-Zellen in Folge der Sequenztherapie deutlich zu Gunsten der CD8 T-Zellen verschoben wird. Die gezielte Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie führt somit zu einer Amplifikation der Virus-getriggerten intratumoralen Infiltration von NK-Zellen sowie CD8 T-Zellen. Zudem war nur in Folge der Sequenztherapie eine signifikante Abnahme immunsuppressiver MDSCs im Tumorgewebe festzustellen (Abbildung 3.34). MDSCs können, wie bereits erwähnt, die anti-tumoralen Effektorfunktionen von NK-Zellen sowie CD8 T-Zellen entscheidend schwächen (Lu et al., 2011; Mao et al., 2014; Nagaraj et al., 2007). Beispielsweise resultierte der Einsatz des Chemotherapeutikums Gemcitabine, das zu einer Reduktion immunsuppressiver MDSCs führt, in einer erhöhten zytotoxischen Aktivität von CD8 T-Zellen und NK-Zellen in Tumor-tragenden Mäusen und einer verbesserten anti-tumoralen Wirkung (Suzuki et al., 2005). Eine präklinische Studie zur Kombination von Gemcitabine und einem onkolytischen Reovirus zur Therapie des Ovarialkarzinoms konnte zeigen, dass die Reduktion von MDSCs die virus-vermittelte Triggerung Tumor-gerichteter T-Zellantworten fördert (Gujar et al., 2014). Die Reduktion der immunsuppressiven MDSCs in Folge der Sequenztherapie könnte somit maßgeblich an der gezeigten Effektivität der T-Zellantworten dieser Therapieform beteiligt sein. Es konnten im weiteren Gr1(Ly-6C/Ly-6G)-positive CD8 T-Zellen identifiziert werden, die in Folge der Virotherapie, aber insbesondere nach der Sequenztherapie deutlich zunehmen und deren Bedeutung noch genauer untersucht werden sollte (Abbildung 3.35). Es ist bekannt, dass Ly6C auf CD8 Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird und diese sich durch eine besonders schnelle Reaktivierbarkeit in Folge eines erneuten Antigenkontaktes und eine hohe IFN γ -Ausschüttung auszeichnen (Matsuzaki et al., 2003; Pihlgren et al., 1996; Walunas et al., 1995). Dies weist daraufhin, dass möglicherweise durch die Sequenztherapie eine effektive Expansion bzw. Infiltration vorhandener Antigen-erfahrener CD8 Gedächtnis-T-Zellen erfolgt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte anhand der Quantifizierung Adpgk-spezifischer CD8 T-Zellen gezeigt werden, dass es in Folge der Sequenztherapie im Vergleich zur alleinigen Virotherapie nicht nur zu einer lokal erhöhten Frequenz von CD8 T-Zellen im Tumorgewebe kommt, sondern auch eine deutliche Amplifikation systemisch getriggelter Tumorantigen-spezifische CD8 T-Zellen erfolgt (Abbildung 3.37).

Die Korrelation zwischen dieser hohen Tumorantigen-spezifischen T-Zellantwort und der sehr guten therapeutischen Wirkung, darunter teilweise vollständige Tumorremissionen (vgl. Abbildung 3.28), deutet auf die funktionelle Beteiligung dieser Zellen am Therapieerfolg hin.

4.6.2 Antikörper-*Retargeting* als Basis für eine effiziente Immuncheckpointblockade

Die Therapie von Tumorerkrankungen mit Immuncheckpointinhibitoren ist eine innovative und gleichzeitig effektive Möglichkeit die Tumor-vermittelte Inhibition von T-Zellantworten zu reduzieren und dadurch langanhaltende anti-tumorale Immunität zu induzieren. Die therapeutische Wirksamkeit von Immuncheckpointinhibitoren konnte in verschiedenen klinische Studien zunächst für das maligne Melanom (Hodi et al., 2010) sowie mittlerweile auch im Kontext anderer Tumorentitäten, wie dem Nierenzellkarzinom oder dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom nachwiesen werden (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012). Dennoch zeigen auch diese Studien einen hohen Anteil an Therapie-resistenten Tumoren. Als limitierende Faktoren für die Wirksamkeit der Immuntherapie wurden mittlerweile verschiedene Parameter identifiziert. Eine hohe Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-L1 im Tumorgewebe korreliert zum Beispiel mit einem besseren Ansprechen auf PD-1 Immuncheckpointblockade (Passiglia et al., 2016; Snyder et al., 2014). Als weiterer prognostischer Faktor für ein Therapieansprechen konnte auch ein hoher initialer Grad an Lymphozyteninfiltraten im Tumorgewebe identifiziert werden (Budczies et al., 2017; Ji et al., 2012). Hierbei ist insbesondere die hohe Frequenz Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen mit dem Erfolg einer Immuncheckpointinhibition assoziiert (Yuan et al., 2011). Im Einklang damit konnten Rizvi et al. zeigen, dass eine hohe Neoantigen-Last ein wichtiger Faktor für ein Therapieansprechen ist und der Anstieg Neoantigen-spezifischer T-Zellen mit einer Tumorregression korreliert (Rizvi et al., 2015). Die immunaktivierende Konversion des Tumormikromilieus durch das Antikörper-*Retargeting* und die damit einhergehende Triggerung Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen könnte daher die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Immuncheckpointinhibition erhöhen. Im MC38pSia-Modell führt eine anti-PD-1 Monotherapie zu einer vorübergehenden Tumorwachstumsinhibition und einem verlängerten mittleren Überleben (Abbildung 3.39). Es tritt jedoch noch während der Therapie ein erneuter deutlicher Tumorprogress ein, wodurch langfristig von einer Resistenz gegenüber der Immuncheckpointinhibition in diesem Tumormodell ausgegangen werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die zeigen konnten, dass MC38-Tumore nur partiell auf PD-1 Blockade als Monotherapie ansprechen (Juneja et al., 2017; Selby et al., 2016). Im Gegensatz dazu resultiert eine Adaptertherapie mit PD-1 Blockade in einer wesentlich erhöhten anti-tumoralen Wirkung. Dies zeigt sich durch ein sehr deutlich inhibiertes Tumorwachstum und ermöglicht ein teilweise tumorfreies Langzeitüberleben der behandelten Individuen (Abbildung 3.39). Im Einklang dazu konnte anhand der Adpgk-spezifischen CD8 T-Zellantwort

gezeigt werden, dass die Adapter-unterstützte PD-1 Blockade in einer deutlich erhöhten Frequenz Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen im Vergleich zur anti-PD-1 Monotherapie resultiert (Abbildung 3.40). Eine besonders hohe Tumorantigen-spezifische CD8 T-Zellantwort konnte hier im Blut derjenigen Individuen nachgewiesen werden, die eine vollständige Tumorremission erfuhren. Dies weist daraufhin, dass die untersuchten Neoepitop-spezifischen CD8 T-Zellantworten zur therapeutischen Effektivität beitragen. Dies wird durch andere Studien gestützt, in denen eine Korrelation zwischen einer hohen T-Zellantwort gegen ein spezifisches Neoantigen und einer Tumoremission gezeigt werden konnte (Rizvi et al., 2015; Van Rooij et al., 2013). Diese Daten bestätigen, dass das Antikörper-*Retargeting*, durch die Immunaktivierung und die Triggerung Tumor-spezifischer T-Zellen, Tumore für eine nachfolgende Immuncheckpointinhibition effektiv sensitiviert. Für einen späteren klinischen Einsatz ist eine Induktion von Antikörpern für das Tumor-*Retargeting* sowohl nach onkolytischer Virotherapie als auch durch die Nutzung prävalenter Immunantworten denkbar, da dieser Ansatz nicht invasiv ist. Gegenüber humanen Adenoviren, darunter auch dem Serotyp 5, besteht eine Antikörper-Prävalenz in einem Großteil der Bevölkerung (Chirmule et al., 1999; Nwanegbo et al., 2004). Ein Austausch der Antikörper-bindenden Domäne des Adapters, gegen die anderer Virustypen mit hoher Antikörper-Seroprävalenz oder gegen die sogar ein genereller Impfschutz besteht, könnte zudem das Anwendungsspektrum weiter verbreitern.

4.6.3 Virotherapie-Antikörper-*Retargeting*-Sequenz als Basis für PD-1 Immuncheckpointblockade

Im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie ist die Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem Antikörper-*Retargeting* eine hoch wirksame Therapiestrategie, die ein Langzeitüberleben ermöglichen kann (Abbildung 3.28). Die synergistische Wirkung wird sowohl durch die starke Immunaktivierung im Tumorgewebe als auch die deutliche Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen untermauert (Abbildung 3.37). Diese hocheffektive Immunaktivierung könnte sich als Basis einer PD-1 Blockade als besonders effektiv erweisen. Um Tumore für eine Immuncheckpointinhibition zu sensitivieren, werden zunehmend onkolytische Viren als geeigneter Immunaktivator diskutiert. Präklinische Studien konnten zeigen, dass die immunaktivierende Wirkung einer onkolytischen Virotherapie, Tumore effektiv für eine Immuncheckpointblockade zugänglich macht (Engeland et al., 2014; Woller et al., 2015; Zamarin et al., 2014). Die synergistische Wirkung beider Therapien beruhen dabei unter anderem auf der Amplifikation Virus-getriggelter Tumorantigen-spezifischer T-Zellantworten durch die anschließende Immuncheckpointinhibition (Woller et al., 2015). Eine erste Studie an Patienten, die eine Kombinationstherapie aus dem bereits für die Therapie des malignen Melanoms zugelassenen onkolytischen Herpesvirus T-Vec und Ipilimumab (anti-CTLA-4) erhielten, lieferte bereits erste positive Ergebnisse, die auf eine erhöhte Wirksamkeit der Kombination hindeuten (Puzanov et al., 2016). Eine

synergistische Wirkung aus Virotherapie und anti-PD-1 Immuncheckpointinhibition kann auch im MC38psia Tumormodell beobachtet werden (Abbildung 3.42). Hierbei erzielt die Kombinationstherapie eine ähnliche therapeutische Wirkung hinsichtlich des Langzeitüberlebens der Versuchstiere wie die Kombination aus Adaptertherapie und PD-1 Blockade. Dies bestätigt, dass sowohl die in Folge der Virotherapie als auch der Adaptertherapie induzierten anti-tumoralen Immunantworten für eine nachfolgende Immuncheckpointinhibition geeignet sind.

Die gezielte und zeitlich abgestimmte Kombination verschiedener Therapien zur kontinuierlichen Immunaktivierung und Überwindung entwickelter Resistenzen ist eine zentrale Herausforderung an künftige Tumormimmuntherapien. In der hier vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang ein hocheffektives integriertes Therapieschemas aus initialer onkolytischer Virotherapie, gefolgt von Adapter-vermitteltem Antikörper *Retargeting* zur effektiven Immunaktivierung und einer Immuncheckpointinhibition gegen PD-1 zur anschließenden Amplifikation der getriggerten Tumorgerichteten T-Zellantworten entwickelt werden (3.6.2). Im verwendeten MC38pSia Modell führt diese gezielte sequenzielle Therapie zu einer vollständigen und dauerhaften Tumorremission in einem Großteil der behandelten Mäuse (Abbildung 3.42). Diese Daten zeigen, dass eine aufeinander aufbauende, gezielte Kombination verschiedener Immuntherapien, einschließlich des hier entwickelten Antikörper-*Retargetings*, eine hoch effiziente Behandlung darstellt, die bestehende Resistenzen gegen die jeweiligen Monotherapien überwinden kann und einen neuen Ansatz für die erfolgreiche Therapie solider Tumore darstellt.

4.7 Ausblick

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass das *Retargeting* viraler Antikörper gegen Tumore mittels bispezifischer Adapterproteine eine wirkungsvolle neue Strategie einer Tumorummuntherapie darstellt. Im Rahmen der Arbeit konnten einige immunologische Mechanismen, die für die Wirksamkeit des Antikörper-*Retargetings* verantwortlich sind, aufgeklärt werden. Dabei konnte ein reduzierender Effekt auf die CD4-Population im Tumor festgestellt werden. Hier wäre zukünftig eine Detailanalyse einzelner CD4-Subpopulationen interessant, um unter anderem zu zeigen, ob möglicherweise bevorzugt regulatorische T-Zellen reduziert werden oder die Therapie Einfluss auf die Frequenz von T-Helfer Zellen und deren Th1/Th2-Polarisation hat. Darüber hinaus spielt die NK-Zell-abhängige Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen eine herausragende Rolle bei der Therapie. Dendritische Zellen bilden eine entscheidende Schnittstelle des T-Zellprimings, daher wären weiterführende Analysen der Antigen-präsentierenden Zellen im Tumor interessant, um den Einfluss auf die Kreuzpräsentation von Tumorantigenen zu untersuchen. Zusätzlich könnte eine erweiterte phänotypische Charakterisierung oder ein adoptiver Transfer, der in Folge der Sequenztherapie aus Virotherapie und Antikörper-*Retargeting* rekrutierten Gr1-positiven CD8 T-Zellen interessante Aufschlüsse über die Funktionalität und die Bedeutung dieser Zellen für die Therapie liefern. Eine Übertragbarkeit des Antikörper-*Retargetings* auf alternative Zielstrukturen durch den Austausch des Tumor-spezifischen Liganden kann ohne Funktionsverlust der Antikörper-bindenden Domäne des Adapters erfolgen. Zukünftig sollte auch die Erweiterbarkeit der Antikörper-bindenden Domäne durch zusätzliche Epitope des Viruskapsids, beispielsweise aus Penton oder Fiber oder der Austausch gegen andere B-Zellantigene anderer Viren untersucht werden, um die Übertragbarkeit auf weitere Infektions-bedingte Immunisierungsszenarien zu ermöglichen. Interessant wäre beispielsweise der Austausch gegen eine Antikörper-bindende Domäne eines alternativen Virus, das nicht nur virotherapeutisch genutzt wird, sondern gegen das ein weitreichender Impfschutz und somit eine breite Seroprävalenz existiert, wie z.B. das Masernvirus. Dadurch könnte einem breiten Spektrum an Patienten ohne aufwendige Voruntersuchungen ein Antikörper-*Retargeting* zugänglich gemacht werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine besonders effiziente Eliminierung Metastasen durch das Antikörper-*Retargeting* ermöglicht wird. Für den Erfolg einer chirurgischen Tumorentfernung spielt die Limitierung nicht detektierbarer Mikrometastasen, die nach der Entfernung des Primärtumors auswachsen können, eine wesentliche Rolle für das progressionsfreie Überleben der Patienten. Das Antikörper-*Retargeting* könnte eine vielversprechende Strategie darstellen, um nach der chirurgischen Entfernung des Primärtumors das Metastasenwachstum und die Bildung eines Lokalrezidivs effektiv zu unterdrücken.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Tabelle 5.1 Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa
Blotkammer Fast Blot B44	Biometra
Blotkammer Netzgerät EPS 200	Pharmacia Biotech
Durchflusszytometer (FACS) FACSCanto™ II	BD
E. Coli Pulser	Bio-Rad
Einbettter	Leica TP1020
Elektroporator	Square Wave CUY21SC NEPAGENE
Gelelektrophoresekammer Typ BM 200/2	Boehringer Ingelheim
Gelelektrophorese Netzgerät ST606	GIBCO
Inkubator	Memmert
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Coulter
Kühlezentrifuge Multifuge X1R	Thermo Scientific Hearius
Luminator	Lumat Berthold LB9507
Mr. Frosty Einfriergerät	Thermo Scientific Nalgene
Photometer	BioTEK Instruments
SDS-Gelkammer Minigel Twin Typ G42	Biometra
SDS-Gelkammer Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra
Schüttelinkubator SM 30 Control	Edmund Bühler
Schwenker DUOMAX 1030	Heidolph Instruments
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Überkopf-Schwenker Reax 2	Heidolph
Ultrazentrifuge	Beckmann
UV-Transilluminator GelDoc 2000	Bio-RAD
Vortex Reax 2000	Heidolph
Wasserbad F12	Julabo
Zellkultur-CO ₂ Inkubator Typ MCO-18AIC	SANYO
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf

5.2 Materialien

5.2.1 Antikörper

Tabelle 5.2 Verwendete Antikörper

FACS			
Spezifität	Klon	Konjugat	Hersteller
α -c-myc	9E11		Santa Cruz Biotechnologie
α -human CD66e (CEA)	CB30		eBioscience
α -mouse CD4	GK1.5	APC/FITC/PE	BioLegend
α -mouse CD8a	53-6.7	PE/FITC	BioLegend
α -mouse CD11b	M1/70	PE/FITC	BioLegend
α -mouse CD11c		APC	BioLegend
α -mouse CD16/32 (TruStain fcX™)	93		BioLegend
α -mouse CD45.2	104	PerCP	BioLegend
α -mouse CD49a	HMa1	APC	BioLegend
α -mouse CD49b	DX5	FITC	BioLegend
α -mouse CD90.2	30-H12	PerCP	BioLegend
α -mouse CD103		PE	BioLegend
α -mouse CD279 (PD-1)	29F.1A12	PE/FITC	BioLegend
α -mouse IgG	Polyklonal	Biotin	eBioscience
α -mouse F4/80	PM8	FITC	BioLegend
α -mouse IFN- γ	XMG1.2	APC	BioLegend
α -mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	APC	BioLegend
α -mouse NK-1.1	PK136	FITC/PE	BioLegend
α -polysialic acid	735		Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Isotyp mouse IgG1	15-6E10A7		abcam
Streptavidin		PE	eBioscience
Westernblot/Histologie/ELISA			
Spezifität	Klon	Konjugat	Hersteller
α -human CD66e (CEA)	CB30		eBioscience
α -mouse CD45	I3/2.3		abcam
α -c-Myc	9E11	HRP	Santa Cruz Biotechnologie
α -polysialic acid	735		Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Horse α -mouse IgG	Polyklonal	HRP	Cell Signaling
Isotyp mouse IgG1	15-6E10A7		abcam
Isotyp rat IgG2b	eB149/10H5		abcam
goat α -rat IgG (H+L)	Polyklonal	Biotin	ThermoFisher scientific
goat α -Mouse IgG (H+L)	Polyklonal	Alexa Fluor® 555	ThermoFisher scientific
Rat α -Mouse IgG1	LO-MG1-2	HRP	Invitrogen
Rat α -Mouse IgG2a	LO-MG2a-3	HRP	Invitrogen
In vivo Experimente			
Spezifität	Klon		Hersteller
α -mouse PD-1 (CD279)	RMP1-14		BioXCell
α -mouse NK1.1	PK136		BioXCell
α -mouse CD8	116-13.1		BioXCell

5.2.2 Peptide

Tabelle 5.3: Verwendete Peptide

Aminosäureaustausche gegenüber dem Wildtyp-Antigen sind unterstrichen

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
DBP43 (<i>adenovirus DNA-binding protein</i>)	FALSNAEDL	ProImmune
Spnb2 R913L (Spectrin- β)	VAVVNQIAL	ProImmune
Adpgk (MC38 Neoantigen)	ASMTN <u>M</u> ELM	ProImmune
Ndufs V491A (CMT64 Neoantigen)	<u>A</u> AVSNMVQKI	ProImmune

5.2.3 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 5.4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Produkt	Hersteller
1 kb ⁺ DNA Ladder	New England BioLabs
Adenin Triphosphat (ATP)	New England BioLabs
Agar Select	Invitrogen TM
Ammonium Persulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ampuwa [®] Wasser	Fresenius Kabi
<i>Antarctic Phosphatase</i> + Puffer	New England BioLabs
Antigen <i>retrieval</i> pH9 (10x)	Dako
ATP	New England BioLabs
Brefeldin A (1000x/5 mg/ml)	BioLegend
BSA (<i>bovine serum albumin</i> , fraction V, pH=7)	Serva
Cäsiumchlorid	AppliChem
Cell Dissociation Buffer, Enzyme-Free, PBS-based	<i>gibco</i> [®] by <i>life technologies</i> TM
Clodronat-Liposomen	ClodronateLiposomes
	Nico van Rooijen
Collagenase Typ IA & IV	Sigma-Aldrich
D-Glucose	Merck
D-Luciferin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Deoxynucleotide (dNTPs)	Invitrogen
Deoxyribonuclease 1(DNase)	Sigma-Aldrich
Dispase	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Promega
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England BioLabs
Eosin Y Solution Aqueous	Sigma-Aldrich
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Faramount Mounting Medium	Dako
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>gibco</i> [®] by <i>life technologies</i> TM
G418 (50mg/ml)	Biochrom (Merck)
Glycerol	<i>gibco</i> [®] by <i>life technologies</i> TM
Glycin	Bio-Rad
Glycylglycin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Histostain Streptavidin-HRP	Invitrogen TM
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
Immidazol	AppliChem

Produkt	Hersteller
Ionomycin Calciumsalz	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Isotonische Kochsalzlösung	Braun
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Ketamin (100 mg/ml Lösung)	Albrecht
L-Histidin	Roth
Lipofectamin (2000 reagent)	Invitrogen
Lysozym	Sigma-Aldrich
Magnesiumulfat (MgSO ₄)	Merck
Mausserumalbumin (MSA)	Sigma-Aldrich
Methanol	J.T. Baker
Mikrobiologisches Magermilchpulver	Merck
Na ₂ HPO ₄	J.T. Baker
NaCl	J.T. Baker
NaH ₂ PO ₄	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS - <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	Sigma-Aldrich
NEB Puffer 1.1/2.2/3.1/CutSmart (10x)	New England BioLabs
MEM NEAA (100x)	gibco® by <i>life technologies</i> ™
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Schuchardt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Na-EDTA	Calbiochemie
Natriumpyruvat (100x)	gibco® by <i>life technologies</i> ™
Ni-NTA Agarose (Beads)	Qiagen
Q5™ (Hot Start High-Fidelity) DNA-Polymerase	New England BioLabs
Paraformaldehyd	Merck
Paraffin	Medite GmbH
Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Polybrene	Sigma-Aldrich
DPBS (10x) – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco® by <i>life technologies</i> ™
PCR-Primer	Eurofins
Pepton	Carl Roth GmbH
PeqGold Prestained Protein Marker IV	PeqLab Biotechnologie GmbH
Phusion Hot-Start II DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience, Inc.
Puromycin Dihydrchlorid	Sigma
RBC(<i>Red Blood Cell</i>)-Lyse-Puffer (10x)	BioLegend
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
Ribonuklease (RNAse)	Boehringer
Rompun (2 % Lösung)	Bayer
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth
Sucrose	ICN Biomedicals
T4 DNA Ligase + Puffer (10x)	New England BioLabs
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trisbase	Applichem
TRIS/EDTA-Puffer (TE; Endotoxin frei)	Qiagen
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom (Merck)

Produkt	Hersteller
Trypton	FlukaBiochemica
Tween 20	Sigma
<i>UltraPure</i> Agarose	GIBCO BRL
Wasserstoffperoxidlösung (H ₂ O ₂) 3 %	Bernd Kraft
X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	Roche

5.2.4 Verwendete Materialien

Tabelle 5.5: Verwendete Materialien

Produkt	Hersteller
15 ml Röhrchen	Sarstedt
50 ml Röhrchen	Greiner
Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance chemiluminescence film	GE Healthcare Life Sciences
Cell Strainer 40 µm Nylon	BD Falcon™
Chirurgisches Nahtmaterial (Stärke 4/0 und 6/0)	Catgut
Deckgläser (Menzel)	Thermo Scientific
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer™ 0,5-3 ml	ThermoScientific
Einbettkassetten	Medite GmbH
Einmalkanülen Sterican (G21/G24/G26/G27)	Braun
Elektroporationsküvetten (Gene Pulser)	Bio-Rad
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Filter Filtropur ø 0,2 µm & ø 0,45 µm	Sarstedt
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Multiply PCR-Platte 96-Well	Sarstedt
Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96-Well Platten	Affymetrix eBioscience
Objektträger	Thermo Scientific
Objektträger Super Frost	Thermo Scientific
Operationsbesteck	Fine Science Tools
Pipettenspitzen; Filtertips	Sarstedt
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Merck Millipore
Reaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 5 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt
Spritzen Omnifix®-F (1 ml/2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	Braun
Wattestäbchen	Heinz Herenz Hamburg
Whatmanpapier	Fisher Scientific GmbH
Zellkulturflaschen T25 & T75 <i>TC treated</i>	Sarstedt
Zellkulturplatten 12-Well/24-Well/96-Well	CELLSTAR®
Zellkulturschalen ø 6 cm	Sarstedt
Zellkulturschalen ø 10 cm	CELLSTAR®
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugationsröhrchen Ultra Clear	Beckmann

5.2.5 Medien

Tabelle 5.6: Verwendete Medien

Produkt	Hersteller
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	gibco® by life technologies™
optiMEM™	gibco® by life technologies™
RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX™-I	gibco® by life technologies™

5.2.6 Kits

Tabelle 5.7: Verwendte Kits

Produkt	Hersteller
AdenoX™ Rapid Titer Kit	Clontech
Plasmid Maxi Kit Endo free(25)	Qiagen
Protein-Assay Kit (Bradford)	Bio-Rad
Western Lightning™ PlusECL Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer
ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research

5.2.7 Puffer und Lösungen

Bakterienkultur:

LB Medium

NaCl	0,5 % (m/v)
Pepton	1 % (m/v)
Hefeextrakt	0,5 % (m/v)

Amp-Selektionsmediumplatten

LB-Medium	
Agar	1,5 % (m/v)
Ampicillin	100 µg/ml

SOC Medium

Trypton	2 % (m/v)
Hefeextrakt	0,5 % (m/v)
NaCl	0,05 % (m/v)
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	0,4 % (m/v)

Stet-Puffer pH=8.0

Trisbase	50 mM
EDTA	50 mM
Sucrose	8 % (m/v)
Triton X	0,5 % (v/v)

Lyse-Puffer

Stet-Puffer	
Lysozym	3,3 % (v/v)

TE pH=8,0

Trisbase	10 mM
EDTA	1 mM

ELISA:

Coating Buffer (ECB) pH 9.5

NaHCO ₃	200 mM
Na ₂ CO ₃	80 mM

Blocking Buffer

1x PBS	
Magermilchpulver	2 % (m/v)

Gelelektrophorese:50x TAE pH=8.5

Trisbase	2 M
Konz. Eissigsäure	5,7 % (v/v)
NaEDTA	3,7 % (m/v)

10x Loading Buffer

Ficoll 400	20 % (v/v)
EDTA pH=8.0	0,1 M
SDS	1 % (m/v)
Bromphenolblau	

Proteinaufreinigung:1 M Phosphatpuffer pH 8.0

1 M NaH₂PO₄ Lösung wurde zu 1 M Na₂HPO₄ Lösung gegeben bis sich ein pH-Wert von 8.0 einstellte.

Waschpuffer

1 M Phosphatpuffer	5 % (v/v)
NaCl	0,3 M
Immidazol	1 mM

Elutionspuffer

1 M Phosphatpuffer	5 % (v/v)
NaCl	0,3 M
L-Histidin	150 mM

Bindepuffer

1 M Phosphatpuffer	50 % (v/v)
NaCl	1,5 M

SDS-Page:10x SDS Lauf-Puffer

SDS	1 % (w/v)
Tris	250 mM
Glycin	1,92 M

5x SDS-Loading-Puffer

TrisHCl pH=6,8	310 mM
DTT	250 mM
Glycerin	20 % (v/v)
SDS	2 % (m/v)
Bromphenolblau	

1 M Tris pH 6.8 + SDS

Trisbase	1 M
SDS	0,8 % (m/v)

1,5 M Tris pH=8.8 + SDS

Trisbase	1,5 M
SDS	0,4 % (m/v)

Viruspreparation:Dialysepuffer

Trisbase pH=8	20 mM
NaCl	25 mM
MgCl ₂	1,25 mM

2x Storage-Puffer

Glycerol	50 % (v/v)
Mausserumalbumin	0,1 % (m/v)
Tris	10 mM
NaCl	100 mM

Cäsiumchlorid 1.2

CsCl ₂	26,5 % (m/v)
1 M Tris pH 7.5	1 % (v/v)

Cäsiumchlorid 1.4

CsCl ₂	53,5 % (m/v)
1 M Tris pH 7.5	1 % (v/v)

WesternBlot:

<u>Transferpuffer</u>		<u>PBS-Tween PH 7.6 (PBS-T)</u>	
Glycin	40 mM	Tris	20 mM
Trisbase	50 mM	NaCl	140 mM
SDS	1 mM	Tween	0,3 %
Methanol	20 % (v/v)		

Blocking-Lösung

PBS-T	
Magermilchpulver	5 % (m/v)

Zellkultur

<u>Zellkulturmedium</u>		<u>Dissoziationpuffer</u>	
DMEM + Glutamax		1x PBS	
FCS	10 % (v/v)	EDTA	0.5 mM
Penicillin/Streptomycin (P/S)	0,01 mg/ml	HEPES	10 mM
		Sodiumpyruvate	1 mM

DC-Medium

RPMI 1640	
FCS	2 %
Penicillin/Streptomycin	0,01 mg/ml
β-Mercaptoethanol	50 μM
MEM NEAA (100x)	1 % (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM

Tumorverdaumedium (+/- Dispase)

RPMI 1640	
DNase	60 μg/ml
Hyaluronidase	0,2 mg/ml
Collagenase IA	0,2 mg/ml
Collagenase IV	0,2 mg/ml
(Dispase	0,3 mg/ml)

Luciferase Messpuffer

Glycylglycin	25 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP	5 mM

5.2.8 Eukaryotische Zelllinien

Etablierte Zelllinien:

HEK293: adhären wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, mit stabiler Integration der adenoviralen E1-Region; in der Arbeit verwendet zur Produktion und Titrierung von Adenoviren. (ATCC-Nr.: CRL-1573)

293T: HEK293 Zellen, die das SV40 T-Antigen stabil exprimieren; in der Arbeit verwendet zur Produktion rekombinanter Proteine. (ATCC-Nr.: CRL-3216)

Phönix-Ampho 293T Zellen, mit stabil integrierten Gag-Pol Genen, ermöglicht die Produktion replikationsdefizienter Viren und diente in der Arbeit als Verpackungszelllinie für retrovirale Partikel. (ATCC-Nr.: CRL-3213)

- PANC01 adhärent wachsende humane Pankreaskarzinomzelllinie. (ATCC-Nr.: CRL-1469)
- H146 Suspensionszelllinie, humane Lungenkarzinomzellen (kleinzelliges Lungenkarzinom, ursprünglich isoliert aus einer Knochenmarksmetastase). (ATCC-Nr.: HTB-173)
- IMR32 adhärent wachsende humane Neuroblastomzelllinie (isoliert aus einer abdominalen Metastase). (ATCC-Nr.: CCL-127)
- TE671 adhärent wachsende humane Rhabdomyosarkomzelllinie. (ATCC-Nr.: CRL-7774)
- CMT64: adhärent wachsende murine Lungentumorzelllinie, ursprünglich isoliert aus dem Lungenkarzinom einer C57BL/1CRF Maus. (ECACC-Nr.: 10032301);
- CMT64pSia: CMT64-Zellen mit stabiler Expression des (oberflächenständigem) polysialylierten neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM). Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin/Puromycin-haltig). (freundlicherweise bereitgestellt von Arnold Kloos, beschrieben in Kloos *et al.* 2015) In der Arbeit eingesetzt zur Etablierung subkutaner Tumore und Lungenmetastasen in der Maus.
- MC38: adhärent wachsende murine Kolonkarzinomzelllinie ursprünglich isoliert aus einer C57BL/6 Maus (erstmalig beschrieben in Corbett *et al.*, 1975; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Thomas Wirth.)
- B16F10: adhärent wachsende murine Melanomzelllinie, isoliert aus einer C57BL/6J Maus (ATCC-Nr.: CRL-6475).
- p287 Lebertumorzelllinie, ursprünglich isoliert aus einem Primärtumor der Leber einer p53^{fl/fl}-Maus, induziert durch *in situ* Elektroporation. Genetischer Hintergrund: p53^{-/-}/Kras^{G12V}/Akt2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jennifer Brooks)
- CMTpSiaDE1/DE1scFvpSia: CMTpSia-Zellen mit stabiler Expression der DE1-Domäne oder des Adapters DE1scFvpSia; Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin/Puromycin-haltig). Während der Arbeit verwendet zur Etablierung subkutaner Tumore. (etabliert während der Zeit meiner Masterarbeit: Etablierung eines molekularen Adapters zum Retargeting humoraler, virusspezifischer Immunreaktionen gegen solide Tumore, 2013, Technische Universität Braunschweig)

Im Rahmen der Arbeit generierte Zelllinien:

MC38pSia: MC38-Zellen mit stabiler Expression von (oberflächenständigem) polysialyliertem NCAM; Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin/Puromycin-haltig); Während der Arbeit eingesetzt zur Etablierung subkutaner Tumore.

MC38hCEA: MC38-Zellen mit stabiler (oberflächenständiger) Expression des humanen Karzinoembryonalen Antigens (hCEA). Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin-haltig). Die Zellen wurden in der Arbeit zur Etablierung subkutaner Tumore verwendet.

MC38pSiaLUC MC38-Zellen mit stabiler Expression von (oberflächenständigem) polysialyliertem NCAM und stabiler Expression der Firefly Luciferase. Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin/Puromycin-haltig);

B16F10pSia: B16F10-Zellen mit stabiler Expression von (oberflächenständigem) polysialyliertem NCAM; Kultivierung erfolgte in Selektionsmedium (Geneticin/Puromycin-haltig). Während der Arbeit eingesetzt zur Etablierung subkutaner Tumore.

V416-1826 Lebertumorzelllinie isoliert aus einem Lebertumor einer p53fl/fl-Maus (B6.129P2-Trp53TM1Brn/J) induziert durch *in situ* Elektroporation; genetischen Hintergrund: p53^{-/-}/pSiaKras^{G12V}. Die Zelllinie exprimiert stabil PolySia auf der Zelloberfläche.

5.2.9 Bakterienstämme

JM109: Modifizierter *Escherichia Coli* Stamm zur stabilen Replikation von Plasmiden mit hoher Quantität. Für alle Klonierungen und zur Amplifikation etablierter Plasmide wurden chemisch-kompetente JM109 verwendet, mit Ausnahme von adenoviralen Plasmiden, hierfür wurden elektro-kompetente JM109 genutzt. Genotyp: F- traD36 lacIq Δ (lacZ)M15 proA+B+/e14-(McrA-) Δ (lac-proAB) thi gyrA96 (Nalr) endA1 hsdR17(rK-, mK+) relA1 supE44 recA1.

5.2.10 Plasmide

Erworbene/Bereitgestellte Vektoren und Plasmide:

phTertAd Expressionsplasmid mit PGK (*Mouse phosphoglycerate kinase 1*)-Promotor, codiert für das onkolytische Adenovirus hTertAd, zur Generierung von Viruspartikeln nach Linearisierung und Transfektion in Produktionszellen. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Thomas Wirth, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), beschrieben in Wirth *et al.*2003)

pQCXIN	Vektor zum retroviralen Gentransfer mit CMV (<i>Human cytomegalovirus</i>)-Promotor und Neomycin Resistenz-Kassette (aus Retro-X™ Q Vector Set, Clontech).
pQCXIP	Vektor zum retroviralen Gentransfer mit CMV-Promotor und Puromycin Resistenz-Kassette. (aus Retro-X™ Q Vector Set, Clontech).
pT3	Expressions-/ Transposonvektor mit EF1α(<i>Human elongation factor-1 alpha</i>)-Promotor und MSC (<i>multiple cloning site</i>) flankiert von ITRs (<i>inverted terminal repeats</i>) zur Translokation der Gensequenz mittels der Sleeping Beauty Transposase (Xin Chen, Addgene plasmid 31789)
pFK4681	Expressionsvektor mit T7-Promotor, enthält die codierende Sequenz für c-myc- und 6xHis-Tag. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Florian Kühnel, (MHH))
pAK1204	Expressionskonstrukt mit CMV-Promotor, enthält die codierende Sequenz für das scFv (<i>single chain fragment variable</i>) gegen Polysialinsäure (scFvpSia) aus dem Antikörper 735 (Frosch et al., 1985) und für das Coxsackie und Adenovirus Rezeptor Leaderpeptid (Car-L). (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Arnold Kloos (MHH))
pNW7188	Retroviraler Vektor mit CMV-Promotor, basierend auf PQCXI, codiert für das Adenovirus5 Hexon. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Norman Woller, (MHH))
pT-2AKras	Klonierungs-/Transposonvektor basierend auf pT3, beinhaltet das Onkogen Kras ^{G12V} hinter einer 2A-Sequenz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Norman Woller, (MHH))
pSB13	Expressionsplasmid mit PGK-Promotor, codiert für die Sleeping Beauty Transposase (SB13), dient zur Translokation von Genen mit flankierenden ITRs (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von David A. Largaespada, University of Minnesota)
pVSV-G:	Vektor mit CMV-Promotor, codiert für das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Der Vektor diente zur Pseudotypisierung retroviraler Viren nach Transfektion in Verpackungszellen (pCMV-VSV-G; Addgene plasmid 8454)
pCEACAM-5	cDNA Plasmid, enthält die Sequenz des humanen karzinogenen embryonalen Antigens (CEACAM-5/CD66e (P06731); R&DSystems)
pPST	Vektor zum retroviralen Gentransfer der murinen Polysialyltransferase PST (<i>alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4</i>) basierend auf pQCXIN; (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Arnold Kloos (MHH), beschrieben in Kloos <i>et al.</i> 2015)
pNCAM	Vektor zum retroviralen Gentransfer der murinen Polysialyltransferase PST basierend auf pQCXIP; (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Arnold Kloos (MHH), beschrieben in Kloos <i>et al.</i> 2015)

- pCre Expressionsplasmid mit PGK Promotor, codiert für die Cre Rekombinase, die loxP Stellen erkennt und spaltet, ermöglicht die Entfernung von Genen mit flankierenden loxP-Sequenzen *in vivo* (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaus Rajewsky, Max-Delbrück-Centrum, Berlin; Addgene plasmid 11543)
- pT-myrAkt Transposonvektor mit PGK Promotor, basierend auf pT3, codiert für konstitutiv aktives AktI (durch eine N-terminalen Myristoylierungssequenz) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Engin Gürlevik (MHH))
- pBscFvhCEA enthält die codierende Sequenz für das scFv Fragment gegen humanes Karzinoembryonales Antigen (hCEA) aus dem monoklonalen Antikörper BW431/26 (vollständige Bezeichnung des Plasmids: 946 pBullet-LK-BW431/26scFv-FC-CD28DLck-CD3zeta; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hinrich Abken, Universitätsklinikum Köln)
- pT-fLuc-L272A Transposonvektor mit EF1 α Promotor, basierend auf pT3, codiert für die mutierte Form der Firefly Luciferase (L272A) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jennifer Brooks, MHH)

Im Rahmen der eigenen Masterarbeit generierte Plasmide/Vektoren:

- pT-DE1 Expressionskonstrukt basierend auf pT3, codiert für die DE1-Domäne des Adenovirus5-Hexonproteins
- pT-FG1 Expressionskonstrukt basierend auf pT3, codiert für die FG1-Domäne des Adenovirus5-Hexonproteins
- pT-FG2 Expressionskonstrukt basierend auf pT3, codiert für die FG2-Domäne des Adenovirus5-Hexonproteins
- pT-DE1pSia Expressions-/Transposonvektor basierend auf pT3, codiert für das Adapterprotein DE1scFvpSia

Im Rahmen der eigenen Masterarbeit generierte Plasmide/Vektoren:

- pT-DE1hCEA Expressions-/ Transposonvektor basierend auf pT3 codiert für das Adapterprotein DE1scFvhCEA
- pT-pSia2AKras Expressions/Transposonvektor basierend auf pT3, codiert für die murine Polysialyltransferase gekoppelt an das Onkogen Kras^{G12V} über eine selbst-spaltende 2A-Sequenz, die zur Koexpression beider Gene nach Translokation (durch SB13) in die Zielzelle dient
- phCEA Vektor zum retroviralen Gentransfer des humanen CEA basierend auf pQCXIN

5.2.11 Oligonukleotide

Tabelle 5.8: Verwendete Primer

Restriktionsschnittstellen sind in Fett gedruckt; ¹Sequenzierungsprimer für pT3-basierte Konstrukte; ²Sequenzierungsprimer für PQCXIN/P- basierte Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz
CAR-L fwd I	AAG CTAGC CGCCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGC
CAR-L fwd II	AA ACGCGT ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGC
CAR-L rev I	ACTCAA ACTT CTGGCGAAATC
CAR-L rev II	ACTCAA ACTT CTGGCGAAATC
DE1 fwd I	GATTT CGCCAGAAGTTT GAGTCCCTACTCTGGCACTGCCTACAACGCC
DE1 fwd II	CCCTACTCTGGCACTGCCTACAACGCC
DE1 rev I	TTCTGAGATGAGTTTTT GTT CGTTGGGCATAGATTGTTGGCCATTAG
DE1 rev II	GAGTGGAGTCTGGGTCATCACAACATCGGAGCCAGAGCCAGATCCTGAGTTGGGCATAGATTGTTGGC CCATTAG
Bezeichnung	Sequenz
DE1 rev III	CTGCAGTTGGACCTGGGAGTGGACACCGGAGCCAGAGCCAGATCCTGAGTTGGGCATAGATTGTTGG CCCATTAG
MycHis fwd I	GAACAAAA ACT CATCTCAGAAGAG
MycHis fwd II	GTAGTGGATTT CGCCAGAAGTTT GAGTGAACAAAA ACT CATCTCAGAAGAG
MycHis rev I	AA ACTAGT ATGGT GATGGT GATGATGTCCGGT
MycHis rev II	GGCGTTGTAGGCAGTGCCAGAGTAGGGATGGT GATGGT GATGATGTCCGGT
FG1 fwd	GATTT CGCCAGAAGTTT GAGTTATGATCCAGATGTTAGAATTATTGAA
FG1 rev	TTCTGAGATGAGTTTTT GTT CACCATTGCCAGCAACATTGAGCGGTA
FG2 fwd	ATTT CGCCAGAAGTTT GAGTGCTAACTACAACATTGGCTACCAGGGC
FG2 rev	TTCTGAGATGAGTTTTT GTT CATCGAAAGAA ACTTTTT CTGGGTAAT
scFvpSia fwd	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTC
scFvpSia rev	TT CTCGAGT CA GGCT GAGGAGACGGTGTCTGAGGTTCC
scFvhCEA fwd	GGTGTCCACTCCCAGGTCCA ACT GCAG
scFvhCEA rev	TT CTCGAGT CA GGCGGG ATCCACTTTGATCTCCACCTT
hCEA fwd	AA ACC GGT ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTT
hCEA rev	TT CTTAAGT TATATCAGAGCAACCCCAAC
2ApSia fwd	AA ACT AGT ATG CGC TCA ATT AGA AAA CGG
2ApSia rev	TT TCC GGA TTG CTT CAT GCA CTT TCC
2ApSia korr fwd	AAA ATC ATA CGG AAG GCT GGC TCC
2A pSia korr rev	GGA GCC AGC CTT CCG TAT GAT TTT
¹ EF1α fwd	CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG
¹ pT rev	CTAGAATGCAGCGGCCGCCACAC
² CMV fwd	GGTCTATATAAGCAGAGCTG
² IRES rev	TATAGACAAACGCACACCG

5.3 Klonierung

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des PCR-Ansatzes in Tabelle 5.9 und des PCR-Programms in Tabelle 5.10.

Tabelle 5.9: PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen
Template (0.01 µg/µl)	1 µl
Forward Primer (10 pM)	1 µl
Reverse Primer (10 pM)	1 µl
Q5 Puffer (5x)	10 µl
dNTPs (50 µM)	3 µl
Q5 DNA-Polymerase	1 µl
DMSO (2 U/µl)	1 µl
H ₂ O	Ad 50 µl

Tabelle 5.10: PCR-Cyclerprogramm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	20 s	} 35
Annealing	57 °C	20 s	
Elongation	72 °C	2-30 s	
Hold	10 °C	∞	1

Mehrere PCR-Fragmente mit überhängenden Enden, wurden in Assembly-PCR-Reaktionen zusammengefügt. Als Template diente eine äquimolare Mischung aller zusammenzuführenden PCR-Fragmente (insgesamt 0,01 µg/µl Template). Eine Liste aller in Arbeit generierten PCR-Fragmente findet sich in Tabelle 5.11.

Tabelle 5.11: Liste der PCR-Reaktionen

PCR-Produkt	Template	Primer
FG1	pNW7188	FG1 fwd/ DE1 rev
FG2	pNW7188	FG2 fwd/ DE1 rev
DE1 I	pNW7188	DE1 fwd I/ DE1 rev I
DE1 II	pNW7188	DE1 fwd II/DE1 rev II
DE1 III	pNW7188	DE1 fwd III/DE1 rev III
CAR-L I	pAK1204	CAR-L fwd I/Car-L rev I
CAR-L II	pAK1204	CAR-L fwd II/Car-L rev II
MycHis I	pFK4681	MycHis fwd I/MycHis rev I
MycHis II	pFK4681	MycHis fwd II/MycHis rev II
scFvpSia	pAK1204	scFvpSia fwd/scFvpSia rev
scFvhCEA	pBscFvhCEA	scFvhCEA fwd/scFvhCEA rev
hCEA	pCEACAM-5	hCEA fwd/hCEA rev
PST	pPST	PSTfwd/ PST rev
PSTΔBspEI	PST	PST korr fwd/ PST korr rev
Assembly-PCR-Reaktionen		
PCR-Produkt	Templates	Primer
CAR-L-DE1-MycHis	CAR-L I/DE1 I/MycHis I	CAR-L fwd I/ MycHis rev I
CAR-L-FG1-MycHis	CAR-L I/FG1/MycHis I	CAR-L fwd I/ MycHis rev I
CAR-L-FG2-MycHis	CAR-L I/FG2//MycHis I	CAR-L fwd I/ MycHis rev I
CAR-L-MycHis-DE1-scFvpSia	CAR-L II/MycHis II/DE1 II/scFvpSia	CAR-L fwd II/scFvpSia rev
CAR-L-MycHis-DE1-scFvhCEA	CAR-L II/MycHis II/DE1 III/scFvhCEA	CAR-L fwd II/scFvhCEA rev

5.3.2 Gelelektrophorese

Die DNA wurde standardmäßig in 1-prozentigen (w/v) TAE-Agarose -Gelen bei ca. 120 V separiert. Für große Fragmente (>1500 bp) wurde ein 0,8-prozentiges (w/v) Agarose-Gel verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde dem noch flüssigen Agarose-Gel Ethidiumbromid (1:50.000 (v/v)) zugesetzt.

5.3.3 DNA-Aufreinigung

DNA-Aufreinigung nach Restriktionsverdau und Klenow *fill-in* erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung von DNA aus Agarose-

Gelen wurden die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers die DNA isoliert.

5.3.4 Restriktionsverdau

Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA bzw. aufgereinigten PCR-Fragmenten erfolgte in 100 µl Gesamtvolumen unter Einsatz von ca. 2 U Restriktionsenzyme pro µg DNA bei 37°C für 2 h. Verwendet wurden hierfür ausschließlich Restriktionsendonukleasen mit ihren entsprechenden Puffern von NEB.

5.3.5 Klenow fill-in

Zur Generierung von *blunt* –Ends (durch das Auffüllen von 5'-Überhängen bzw. die Entfernung von 3'-Überhängen) wurde das große Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (*E. coli*) verwendet. DNA-Fragmente wurden hierfür nach dem Restriktionsverdau durch die Zugabe von 2U Klenow/ µg DNA und 50 µM dNTPs in Klenow-Puffer (NEB Puffer 2) für 20 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Klenow-Fragmentes gestoppt (75°C; 20 min).

5.3.6 Dephosphorilierung

Um die spontane Relegierung von DNA-Fragmenten mit passenden Enden zu verhindern wurden die DNA-Enden durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (*Antarctic Phosphatase*; NEB) dephosphoriliert. Dephosphorilierung erfolgte mit 1U Enzym pro 1 µg DNA für mindestens 1 h bei 37°C in entsprechend gepufferter Lösung (*Antarctic Phosphatase* - Puffer).

5.3.7 Ligation

Die Ligation passender DNA-Ende erfolgte unter Verwendung der T4-DNA Ligase. Insert-DNA wurde in 10-fachem molekularem Überschuss zum entsprechenden Backbone gegeben und in 20 µl Gesamtreaktionsvolumen mit 0,25 mM ATP und T4 Ligase Puffer (NEB) mit ca. 4U Ligase/µg DNA versetzt. Ligation erfolgte im Anschluss bei 16°C über Nacht. Eine Liste der Ligation findet sich in Tabelle 5.12.

Tabelle 5.12: Liagtionsreaktionen

Vektorprodukt	Backbone	Insert
pT-DE1	pT3 (<i>NheI/SpeI</i>)	Assembly-PCR-Produkt Car-L-DE1-MycHis (<i>NheI/SpeI</i>)
pT-FG1	pT3 (<i>NheI/SpeI</i>)	Assembly-PCR-Produkt Car-L-FG1-MycHis (<i>NheI/SpeI</i>)
pT-FG2	pT3 (<i>NheI/SpeI</i>)	Assembly-PCR-Produkt Car-L-FG2-MycHis (<i>NheI/SpeI</i>)
pT-pSia2AKras	pT-2AKras (<i>SpeI/BspEI</i>)	PCR-Produkt PSTΔBspEI (<i>SpeI/BsPEI</i>)
pT-DE1pSia	pT3 (<i>MluI/XhoI</i>)	Assembly-PCR-Produkt Car-L-MycHis-DE1-scFvpSia (<i>MluI/XhoI</i>)
pT-DE1shCEA	pT3(<i>MluI/XhoI</i>)	Assembly-PCR-Produkt Car-L-MycHis-DE1-scFvhCEA (<i>MluI/XhoI</i>)
phCEA	PQCXIN (<i>AgeI/EcoRI</i>)	hCEA aus pCEACAM-5 (<i>AgeI/EcoRI</i>)

5.3.8 Transformation

Chemische Transformation:

Zur Transformation rekombinanter DNA in chemisch kompetente Bakterien (JM109) wurden 10 µl Ligationsansatz mit 100 µl Bakteriensuspension gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Anschließend wurden die Transformationsansätze sofort auf Eis gestellt, mit 1 ml SOC-Medium versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation:

Zur Transformation von adenoviraler Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 80 µl Bakteriensuspension (JM109 elektrokompent) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension blasenfrei in eine Elektroporations-Küvette überführt und die DNA mittels Elektroporation mit 1,8 V (*E.Coli* Pulser; Biorad) in die Zellen eingebracht. Elektroporierte Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.3.9 Analytische DNA-Präparation

Zur analytischen Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen nach Transformation wurden einzelne Klone gepickt und in jeweils 3 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 1,5 ml der Bakterienkulturen in Reaktionsgefäße überführt und die Zellen pelletiert (10000 g, 1 min). Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl verworfen und das Pellet im Rest-Medium resuspendiert. Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl Lysozymlösung (Lysozym 1:30 in Stet-Puffer) und anschließende Inkubation für 90 s bei 95°C lysiert. Die Zellreste wurden im Folgenden für 15 min bei 20000 g und 4°C pelletiert, das Pellet im Anschluss entfernt und die DNA im Überstand durch die Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Gefällte DNA wurde durch erneute Zentrifugation (20000 g, 10 min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

5.3.10 Kontrollverdau und Sequenzierung

Zur Analyse der DNA nach analytischer Präparation aus Bakterienklonen wurde die isolierte Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und im Anschluss die DNA-Fragmente über Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Bandenanzahl und -größe wurden korrekte Konstrukte (Korrekte Orientierung und Größe des Inserts im Backbone) identifiziert und die Sequenz über Sequenzierung mit entsprechenden Primern final überprüft (Sequenzierungen erfolgten über GATC Biotech). Für pT3

basierte Plasmide wurden die (Sequenzierungs-) Primer EF1 α fwd und pT rev genutzt, für pQCXIN/pQCXIP Konstrukte die Primer CMV fwd und IRES rev-

5.3.11 Quantitative DNA-Präparation

Die quantitative Plasmidpräparation erfolgte standardmäßig mit dem ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit. Hierzu wurden 250 ml LB-Amp-Medium mit 500 μ l Vorkultur (aus dem Rest der 3 ml Übernachtskulturen siehe 5.3.9) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden 150 ml der Bakterienkultur pelletiert (5000 g, 15 min, 4°C) und DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

DNA-Präparation von adenoviralen Plasmiden

Zur DNA-Präparation adenoviraler Vektoren wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Endo-free) verwendet. Hierbei wurden die gesamten 250 ml Übernachtskultur eingesetzt, Zellen pelletiert (5000 g, 15 min, 4°C) und nach den Angaben des Herstellers die DNA aufgereinigt.

5.3.12 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration isolierter Plasmid-DNA wurde die DNA-Lösung 1:200 in TE-Puffer (pH=8) verdünnt und die Absorption bei 260 nm photometrisch im Vergleich zum entsprechenden Puffer bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht ca. 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 37 μ g/ml einzelsträngiger DNA. Im Anschluss wurden die DNA-Lösungen auf jeweils 1 μ g/ml eingestellt.

5.4 Virologie

5.4.1 Retrovirale Transduktion

Zur stabilen Integration und Expression von Genen in eukaryotischen Zellen wurden diese mit Hilfe retroviraler Vektoren transduziert und im Anschluss mit Hilfe entsprechender kointegrierender Selektionsmarker isoliert.

Produktion retroviraler Partikel in Verpackungszellen

Zur Generierung retroviraler Partikel zum Gentransfer wurden retrovirale Vektorplasmide (auf Basis von pQCXIN bzw. pQCXIP) mit pVSV-G (zur Pseudotypisierung der Viruspartikel) in Phoenix Amphozellen (Verpackungszelllinie) kotransfiziert. Die Zellen wurden hierzu einen Tag vor Transfektion in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät (1×10^6 Zellen pro Schale) und am nächsten Tag das Zellkulturmedium entfernt und durch 4 ml serumfreies DMEM-Medium ersetzt. Für jeweils 2 Schalen wurden 6 μ g des retroviralen Vektors mit 4 μ g pVSV-G in 200 μ l in serumfreiem Medium gemischt und 200 μ l Lipofectamin-Lösung (30 μ l Lipofectamin + 170 μ l Medium) zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss vorsichtig auf 2 Schalen verteilt (je 200 µl je Schale). 4 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 4 ml frisches serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt.

Transduktion und Selektion der Zielzellen

48 h nach Transfektion der Produktionszellen wurde der virushaltige Kulturüberstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wurde zur Separierung der Viruspartikel von mitaufgenommenen Produktionszellen bzw. Zellresten filtriert (0,45 µm). Das (virushaltige) Filtrat wurde mit 4 mg/µl Polybrene (fördert die Aufnahme von Viruspartikeln durch die Zielzellen) vermischt und auf die tags zuvor ausgesäten Zielzellen (4 x 10⁵/ 6 cm Schale) gegeben. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurden die Überstände von 2 Schalen Produktionszellen für eine Schale Zielzellen verwendet. Die Applikation des Überstandes erfolgte dabei sequenziell, zunächst wurde der Überstand einer Schale zu den Zielzellen gegeben und 4 h später durch den Überstand der 2. Schale ersetzt. Nach weiteren 4 h wurde das Medium der Zielzellen auf normales Zellkulturmedium gewechselt. 48 h nach Transduktion wurden die Zielzellen passagiert und transduzierte Zellen in Selektionsmedium expandiert.

5.4.2 Adenoviren

In der Arbeit wurde ausschließlich mit dem onkolytischen Adenovirus hTertAd gearbeitet (Wirth *et al.*; 2003). hTertAd ist ein humaner Adenovirus Serotyp 5 und gehört zu den konditionell replizierenden onkolytischen Viren. Die Tumorspezifität wird durch die Kontrolle der Replikationsessentiellen Gene unter dem humanen Telomerasepromoter (hTert) erreicht. Dies führt zu einer selektiven Replikation in Zellen mit aktivem Telomerasepromotor.

5.4.3 Präparation von Adenoviren

Plasmidlinearisierung und Transfektion

5 µg des Plasmides phTertAd (siehe Plasmide unter 5.2.10) wurden durch zweistündigen Verdau bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease PacI linearisiert (sieheTabelle 5.13). Im Anschluss erfolgte die Transfektion in HEK293 Zellen mittels XtremeGene 9 Transfektionsreagenz (Ansatz siehe Tabelle 5.14Tabelle 5.14). Hierzu wurde die linearisierte DNA mit dem zuvor in Optimem verdünnten Transfektionsreagenz versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss vorsichtig auf eine 80 % konfluente T25 Zellkulturflasche gegeben.

Tabelle 5.13: Linearisierung von phTertAd

Reagenz	Volumen
phTertAd (1 µg/µl)	5 µl
NEB Puffer 1	5 µl
BSA (10 µg/µl)	5 µl
Pacl (10 U/µl)	1,5 µl
H ₂ O	Ad 50 µl

Tabelle 5.14: Transfektionsansatz

Reagenz	Volumen
Restriktionsverdau (phTertAd/Pacl)	50 µl
Optimem	5 µl
XtremeGene 9	5 µl

Viruspassage

5 Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit dem Zellkulturmedium vorsichtig ab gespült und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 800 g und 4°C für 10 min pelletiert, der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl Dialysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Zum Aufschließen der Zellen wurden diese insgesamt dreimal eingefroren, wieder aufgetaut und zwischendurch gevortext. Schließlich wurden die Zellreste bei 800 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert und der virushaltige Überstand auf eine ca. 90 % konfluente T25 Zellkulturflasche 293 Zellen (in 2 % FCS + P/S DMEM) ausgetropft. Erneute Viruspassage erfolgte alle 48 h bis ein zytopatischer Effekt (rundliche Zellform, teilweise bis vollständiges Ablösen der Zellen vom Flaschenboden) zu erkennen war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wie zuvor beschrieben ab gespült, pelletiert und in Dissoziationspuffer aufgeschlossen. Der virushaltige Überstand wurde im Anschluss auf 4 T25 Flaschen verteilt und fortan mit jeder Passage (alle 48 h) stetig weiter expandiert (4xT75->16xT75->40xT75). Bei einer Menge von 40 T75 Zellkulturflaschen wurden die Zellen geerntet und in insgesamt 5 ml Dialysepuffer aufgenommen und bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert.

Virusaufreinigung über Cäsiumchloridgradientenzentrifugation

Die Zellen (der 40 T75 Flaschen) wurde durch insgesamt zweimaliges einfrieren/auftauen aufgeschlossen und die Zellreste bei 800 g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und das Zellpellet mit 2 ml frischem Dialysepuffer gespült. Beide Röhrchen wurden erneut zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 10 min) und die Überstände in einem sauberen 15 ml Röhrchen vereinigt, welches im Anschluss ein weiteres Mal zentrifugiert wurde.

Der Cäsiumchlorid(CsCl)gradient wurde mittels zweier unterschiedlich konzentrierter CsCl-Lösungen hergestellt. 3,5 ml der dichteren Lösung (1,4 mg/ml CsCl) wurden in ein Zentrifugationsröhrchen (Polypropylenröhrchen, Beckmann) vorgelegt und mit 3,5 ml der Lösung mit geringerer Dichte (1,2 mg/ml) vorsichtig überschichtet, sodass in der Mitte eine Phasentrennung zu erkennen war. Im Anschluss wurde der Gradient vorsichtig mit dem virushaltigen Überstand nach der letzten Zentrifugation überschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, keine Zellreste zu überführen. Der überschichtete Gradient wurde folgend bei 28000 g, 6°C und <20 µ Vakuu über 3,5 h zentrifugiert (Rotor SW32, Beckmann).

Nach Zentrifugation waren 2 getrennte Banden erkennbar (siehe Abbildung 5.1), die untere Bande (beinhaltet vollständige Viruspartikel) wurde mittels einer 2 ml Spritze mit 0,55 mm Kanüle (G24 Braun) nach dem seitlichen Durchstechen der Röhrchenwand abgezogen ohne dabei Teile der oberen Bande (mit defekten Partikeln) abzunehmen.

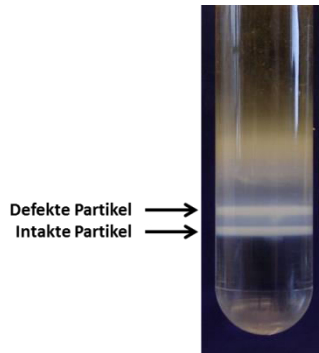


Abbildung 5.1: CsCl-Gradient mit aufgetrennten Viruspartikelbanden

Dargestellt ist der CsCl-Gradient einer hTertAd-Präparation mit aufgetrennten Virusbanden nach Ultrazentrifugation. Die obere Bande enthält überwiegend defekte Partikel, während die intakten Viruspartikel in der unteren Bande aufkonzentriert sind.

Die aufkonzentrierte Viruslösung wurde zur dauerhaften Lagerung 1:1 mit Storagepuffer versetzt und bei -20°C (in flüssiger Form) gelagert.

Virusdialyse

Die Viruslösung wurde vor der weiteren Verwendung dialysiert. Hierbei wurde die konzentrierte Stocklösung in eine Dialysekassette injiziert und gegen Dialysepuffer dialysiert. Hierzu wurde die gefüllte Dialysekassette unter leichtem Rühren für 1 h bei 4°C in Dialysepuffer inkubiert. Im Anschluss wurde der Puffer gegen 1 L frische Lösung ersetzt und es folgte eine weitere Stunde Inkubation. Danach wurde die Viruslösung aus der Kassette abgezogen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

5.4.4 Titrierung von Adenoviren

Rapidtitier

Zur Quantifizierung der infektiösen Partikel wurden serielle Verdünnungsreihen des Virusstocks nach Gradientenzentrifugation (nicht dialysiert) in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FCS + P/S) angesetzt (10^{-4} - 10^{-9}). Je $100\ \mu\text{l}$ jeder Verdünnung wurde auf ein 90 % konfluentes *Well* 293-Zellen einer 24-Well Zellkulturplatte gegeben (24 h zuvor wurden hierfür je 2×10^5 293-Zellen je *Well* in 1 ml Medium ausplattiert). Die Infektion von Wells erfolgte jeweils in Duplikaten. 48 h nach Infektion wurden die Wells auf zytopathischen Effekt (Lyse) unter dem Mikroskop untersucht. Die Verdünnungsstufe, die keine Zelllyse mehr aufwies, sowie die 2 nächst höheren Verdünnungen wurden im Anschluss zur Titerbestimmung herangezogen (Bsp.: 10^{-4} zeigt Lyse, 10^{-5} zeigt keine Lyse --> ausgewertet werden 10^{-5} - 10^{-7}). Das Zellkulturmedium wurde aus allen Wells entfernt und die Zellen durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol (100 %, -20°C) und anschließender Inkubation bei -20°C für mindestens 20 min fixiert. Danach wurde das Methanol entfernt und die zu analysierenden Wells dreimal mit je 1 ml 1%

BSA-Lösung (in PBS) gewaschen. Die Färbung infizierter Zellen erfolgte mittels des AdenoX™ Rapid Titer Kits von Clontech. Der 1. Antikörper (mouse α -Hexon) wurde 1:1000 in PBS verdünnt und je 250 μ l je Well eingesetzt. Die Platte wurde für 1 h bei 37°C und leichtem Schwenken (60 rpm) inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal mit 1 % BSA-Lösung gewaschen und je Well mit 500 μ l 5 % Magermilchpulver in PBS für 30 min bei 37°C geblockt. Der Sekundärantikörper (α -mouse HRP) wurde in 5 % Milchpulverlösung (in PBS) 1:500 verdünnt und (nach Entfernung der Milchpulverlösung aus den Wells) die Wells mit 300 μ l Antikörperlösung eine weitere Stunde bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Wells wurden nachfolgend dreimal mit 1 % BSA-Lösung gewaschen und mit 250 μ l Substratlösung (DAB-Substrat 1:10 in 1x Peroxidasepuffer) versetzt. Sobald eine braune Zellfärbung eintrat, wurde die Substratlösung abgenommen und die Wells mit 500 μ l PBS gefüllt. Die gefärbten (= infizierten) Zellen pro Well wurden bestimmt und mittels des Verdünnungsfaktors die infektiösen Partikel pro Milliliter Stocklösung bestimmt.

OD-Messung

Zur Quantifizierung der gesamten Viruspartikel (infektiös und nicht infektiös) wurde die Absorption bei 260 nm bestimmt. Virusstock sowohl nach Gradientenzentrifugation als auch nach Dialyse wurde 1:20 in 0,1-prozentiger SDS-Lösung verdünnt und die Absorption bei 260 nm vergleichend zum entsprechenden Leerwert (CsCl-Gradient + Storagepuffer 1:1 bzw. Dialysepuffer der 2. Inkubationsphase) bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht ca. 1×10^{12} Viruspartikeln. Durch die anschließende Bestimmung des Anteils infektiöser Partikel (ermittelt über RapidTiter) an der Gesamtpartikelzahl, lässt sich eine Aussage über die Qualität der Viruspräparation treffen. Für Tierexperimente wurde ein Verhältnis zwischen 1/10 und 1/20 (infektiöse Partikel/Gesamtpartikel) verwendet. Zudem kann so die Menge infektiöser Partikel nach Dialyse errechnet werden, die Abnahme in der Absorption entspricht damit der Abnahme an Gesamtpartikeln und folglich auch an infektiösen Partikeln pro ml Virusstock.

5.5 Zellkultur

5.5.1 Kultivierung

Alle verwendeten eukaryotischen Zellen (siehe 5.2.8) wurden im Allgemeinen bei 37°C und 5 % CO₂ in 10-12 ml DMEM mit 10 % FCS und P/S in 250 ml Zellkulturflaschen (T75) kultiviert. Zellen, die in Selektionsmedium kultiviert wurden, erhielten Zusätze von 1 mg/ml Geneticin (bei entsprechender Neomycin-Resistenzkassette) bzw. 1 μ g/ml Puromycin (bei entsprechender Puromycin-Resistenzkassette)

5.5.2 Zellpassage

Die Zellen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium entfernt, der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen und nach Entfernung des PBS die Zellen mit 1 ml 1xTrypsin-Lösung versetzt und bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden lösten (nach ca. 5-10 min) wurden die Zellen mit 10 ml Zellkulturmedium (FCS-haltig zur Inaktivierung des Trypsins) ab gespült und 1/5 - 1/10 der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit 10-12 ml Kulturmedium überführt.

5.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 80 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Färbelösung (zum Anfärben toter Zellen) versetzt und 10 µl in eine Neubauerzählkammer gegeben. Die lebenden Zellen aus 4 Großquadraten (4x16 Kleinquadrate) wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Durchschnitt pro Großquadrat bestimmt. Mit diesem Wert und unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren ergibt sich folgende Formel zur Bestimmung der Zellzahl pro ml: Zellzahl pro Großquadrat $\times 10^4 \times 1,25$.

5.5.4 Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen, wurden diese in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Zellen einer 90 % konfluenten Zellkulturflasche wurden dafür mit 1x Trypsin abgelöst, mit Zellkulturmedium ab gespült und in einem 50 ml Falcon bei 150 g und 4°C für 8 min pelletiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen, die Zellen in Einfriermedium (2 ml pro Zellen einer T75 Flasche) aufgenommen und in 1,5 ml Kryogefäßen aliquotiert (1 ml Zellsuspension pro Röhrchen). Im Anschluss wurden die Zellen langsam auf -80°C (1°C pro Minute) runtergekühlt und verblieben 24 h bei -80°C. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

5.5.5 Aufbereitung von Zellen zur Injektion in die Maus

Zellen die zur Injektion in die Maus dienen sollten, wurden mit enzymfreiem Dissoziationspuffer vom Flaschenboden gelöst, um die Oberflächenstrukturen der Zellen zu erhalten (z.B. Polysialinsäure auf NCAM). Das Zellkulturmedium wurde hierzu entfernt und die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen, um verbleibende FCS-Rückstände zu minimieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1,5 ml Dissoziationspuffer (je 250 ml Zellkulturflasche) bei 37°C für 5-10 min abgelöst und die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 8 min bei 150 g und 4°C pelletiert, im Anschluss mit 50 ml PBS gewaschen und an dieser Stelle wie unter 5.5.3 beschrieben die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation (8 min, 150 g, 4°C) wurden die Zellen in PBS für subkutane Injektionen (1×10^7 Zellen/150 µl) bzw. in isotonischer Kochsalzlösung (3×10^5 Zellen/200 µl) für intravenöse Injektionen aufgenommen.

5.5.6 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Zur hohen transienten Expression von Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen erfolgte die Transfektion der Zellen mit PEI. Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 10 cm Schalen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ Schale ausgesät. Pro 10 cm Schale wurden 5 µg Plasmid-DNA in 300 µl serumfreien Medium verdünnt und mit 15 µg PEI in 300 µl serumfreien Medium vermischt. Der Ansatz wurde im Anschluss für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde entfernt und die 600 µl Transfektionsreagenz direkt auf die Zellen getropft. Darauffolgend wurden die Schalen mit 6 ml serumfreiem Medium aufgefüllt und für 4 h bei 37°C 5 % CO₂ im Zellkulturinkubator kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium durch normales Zellkulturmedium (10 % FCS) ersetzt.

5.5.7 Stabile Transfektion mit PEI und Sleeping Beauty Transposase

Zur stabilen Transfektion von Zellen wurde das Sleeping Beauty Transposase System genutzt. Hierbei werden Gene von *inverted repeat* – Sequenzen (ITRs) umgeben in einem Vektorplasmid integriert, durch die Kotransfektion mit einem Expressionsplasmid für die Sleeping Transposase stabil in das Zellgenom eingebracht. Zielzellen wurden hierfür am Tag vor Transfektion in 6 cm Schalen mit einer Zelldichte von 6×10^5 Zellen pro Schale ausgesät. Pro Schale wurden 0,1 µg SB13 (codiert für die SB-Transposase), 2,15 µg Vektorplasmid (mit dem zu transferierendem Gen) und 0,25 µg eines Vektorplasmides mit Puromycinresistenz-Kassette (ebenfalls flankiert von ITRs) eingesetzt. Die Kotransfektion des Vektorplasmids mit Puromycinresistenz dient zur späteren Selektion stabil transfizierter Zellen, durch die vergleichsweise geringe Konzentration dieses Vektors ist davon auszugehen, dass entstehende transfizierte Zellen mit Puromycinresistenz ebenfalls das eigentlich zu transfizierende Gen enthalten. Die DNA (insgesamt 5 µg pro 6 cm Schale) wurde in 200 µl serumfreiem Medium verdünnt und mit 15 µg PEI in ebenfalls 200 µl serumfreiem Medium vermischt. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt auf die Zielzellen getropft (Zellkulturmedium wurde zuvor entfernt). Die Schalen wurden im Folgenden mit 3 ml serumfreiem Medium aufgefüllt und für 4 h im Zellkulturinkubator inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Danach wurde das Medium durch serumhaltiges Zellkulturmedium (10 % FCS) ausgetauscht und die Zellen 48 h weiter kultiviert. Danach wurden die Zellen abgelöst und stabil transfizierte Zellen in Selektionsmedium mit Puromycin expandiert.

5.5.8 Etablierung von Primärzellkulturen

Zur Etablierung von Primärzellkulturen aus entnommenem Tumorgewebe erfolgte die Aufbereitung von Einzelzellsuspensionen wie unter 5.7.12 beschrieben (unter Verwendung von Tumorverdaumedium mit Dispase). Die Zellen wurden im Anschluss in eine T25-Zellkulturflasche mit 6 ml Zellkulturmedium gegeben. Zur Entfernung toter Zellen wurde das Medium die ersten 3 Tage täglich gewechselt. Nach

Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde 1/5 der Zellen in eine frische Zellkulturflasche passagiert (siehe 5.5.2). Die Zellen wurden weiterpassagiert bis sich eine homogene Tumorzellkultur entwickelte (ohne erkennbare Anteile anderen Zelltypen, z.B. Fibroblasten oder Hepatozyten), diese stellte sich nach ca. 5-7 Passagen ein. Im Anschluss wurden die Zellen expandiert und in Aliquots eingefroren (siehe 5.5.4).

5.5.9 Komplement-Aktivierungs-Assay

Zur Bestimmung einer Adapter-vermittelten Komplement-Aktivierung, wurden die Luciferase-exprimierenden Tumorzellen (MC38pSiaLUC p53-Akt2-Luc) genutzt. Es wurden 1×10^4 Tumorzellen je Well einer 96-Well Platte, 0,5 μg Adapterprotein (DE1scFvpSia) und 20 μl Blutserum Ad5-immunisierter Mäuse nativ oder zuvor bei 56°C für 10 min zur Inaktivierung der enthaltenen Komplementfaktoren eingesetzt. Bei einer Komplementaktivierung, resultierend in einer Tumorzelllyse, kommt es zur Freisetzung der Luciferase in den Zellüberstand. Die Luciferase Aktivität im Überstand wurde anschließend nach 1 h, 4 h und 20 h bestimmt.

5.5.10 Luciferasemessung

Bei der Umsetzung von Luciferin durch das Enzym Luciferase wird Licht emittiert. Dies kann in Form von *relative light units* (RLU) quantifiziert wird. Zur Quantifizierung der Luciferase im Zellkulturüberstand, wurden 300 μl Luciferase-Messpuffer mit 25 μl Zellkulturüberstand versetzt, kurz gevortext und anschließend die Lumineszenz nach Zugabe von 100 μl Luciferinlösung bei einer Messzeit von 10 s am Luminometer gemessen.

5.6 Proteinbiochemische Methoden

5.6.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine wurden 293T-Zellen in 10 cm Platten ausgesät und wie unter 5.5.6 beschrieben transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellüberstände der Schalen vereinigt und filtriert (0,45 μm Filter). Die Zellen wurden im Anschluss mechanisch abgelöst (unter Verwendung eines Zellschabers) und mit einem Teil des gefilterten Kulturüberstands abgespült. Um die Zellen aufzuschließen, wurden diese 2-fach in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Im Anschluss wurden die Zellreste pelletiert (1500 g, 8 min, 4°C), der proteinhaltige Überstand abgenommen und gefiltert (0,45 μm Filter) und im Anschluss mit dem zuvor gefilterten Kulturüberstand vereinigt. Das Medium wurde mit Bindungspuffer im Verhältnis 1:10 (Puffer:Medium) versetzt und in 50 ml Röhrchen gefüllt. Je Röhrchen wurden 450 μl Ni-NTA Agarose-Beads zur Bindung von Proteinen mit 6xHis Tag zugegeben (alle in der Arbeit generierten rekombinanten Proteine verfügen über einen

6xHis -Tag). Es folgte die Inkubation der Röhrcchen über Nacht bei 4°C im Überkopfschwenker. Am nächsten Tag wurden die Beads (mit den gebundenen Proteinen) pelletiert (300 g, 10 min, 4°C) und der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgenommen. Die Beads wurden im Anschluss in einem Röhrcchen (50 ml) vereinigt und zweimal mit 20 ml Waschpuffer gewaschen, wobei zwischendurch eine erneute Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 min erfolgte. Der Waschpuffer wurde im Anschluss bis auf einen kleinen Rest verworfen und die Beads in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Resten des Waschpuffers wurden die Beads nochmals pelletiert (4500 g, 4°C, 5 min) und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Die Beads wurden zur Elution des gebundenen Proteins in Elutionspuffer aufgenommen (mit L-Histidin zur kompetitiven Bindung an die Beads und Freisetzung der Proteine). Hierbei wurde ein 1:1 Verhältnis (v/v) von pelletierten Beads zu Elutionspuffer verwendet. Die Elution erfolgte im Anschluss bei 4°C im Überkopfschwenker, danach wurden die Beads pelletiert (25000 g, 4°C, 15 min) und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Dieser wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmengen im Eluat nach Proteinaufreinigung wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 führt dabei zu Verschiebung des Absorptionsmaximums des ungebundenen Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm nach Proteinbindung. Es wurden serielle Verdünnungen des Protein-Eluats in Elutionspuffer erstellt und jeweils 2 µl jeder Verdünnung sowie als Nullwert 2 µl Elutionspuffer in 798 µl Wasser gegeben und gut gemischt. Im Anschluss wurde jeweils 200 µl Bradford-Lösung (Biorad-Dye-Reagent-Concentrate) zugeben und gut durchmischt. Die Absorption bei 595 nm wurde im Spektralphotometer gemessen und anhand einer parallel gemessenen BSA-Eichgeraden (0,5 µg – 12 µg/µl ebenfalls in Elutionspuffer) die Proteinkonzentration bestimmt.

5.6.3 ELISA

Die quantitative Analyse der Bindungen anti-viraler Antikörper an die adenovirale Virushülle bzw. rekombinante Adapterproteine erfolgte mittels ELISA. Hierzu wurden ELISA-Platten (96-Well) über Nacht bei 4°C mit Viruspartikeln oder aufgereinigtem Protein in ELISA-Coating-Puffer beschichtet. Pro Well wurden hierbei 1×10^8 Viruspartikel (Gesamtpartikel sowohl infektiös und als auch nicht infektiös) in 100 µl Puffer bzw. 1 µg Protein in 100 µl Puffer eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgeschlagen und die Viruspartikel durch UV-Bestrahlung inaktiviert. Freie Bindungsstellen wurden mit 340 µl Blockierungslösung (2 % Milchpulver in PBS) pro Well für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) abgesättigt. Im Anschluss wurden die Platten erneut ausgeschlagen und je Well 100 µl Blutserum

immunisierter oder naiver Mäuse 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt zugegeben. Ein Teil des Serums wurde zuvor mit Proteinen zur Bindung Protein-spezifischer Antikörper vorinkubiert. Hierbei wurden 5 µg Protein je 100 µl Serumverdünnung eingesetzt und vor Einsatz im ELISA bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die mit Serumverdünnungen versetzten Platten wurden für 2 h bei RT und leichtem Schwenken (500 rpm) inkubiert. Danach wurden die Platten ausgeschlagen und dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe eines HRP gekoppelten Zweitantikörpers zur Detektion gebundener Maus- IgGs (Antikörperverdünnung: 1:3000 in Blockierungslösung; 100 µl pro Well). Die Platten wurden daraufhin weitere 1,5 h bei 500 rpm und RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde im Anschluss durch Ausschlagen der Platten entfernt und die Wells dreimal mit dest. H₂O gewaschen. Zur Entwicklung des ELISAs wurde das BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set verwendet. Es wurden hierzu Substrat Reagenz A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und je Well 100 µl eingesetzt. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden 60 µl 1 M H₃PO₄ in jedes Well gegeben und im Anschluss die Absorption der Proben bei 450 nm photometrisch gemessen.

5.6.4 SDS-Page

Die Separierung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Hierbei wurde ein 10 %-Trenngel, überschichtet mit einem 5 %-Sammelgel verwendet (Gelzusammensetzung siehe Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel für SDS-Page (Angaben für 1 Gel)

Reagenz	Volumen	
	Trenngel	Sammelgel
Dest H ₂ O	3 ml	1,74 ml
1 mM Tris pH 6,8 + SDS	--	312,5 µl
1,5 mM Tris pH 8,8 + SDS	1,88 ml	--
Acrylamid-Mix (Rotiphorese® Gel 30)	2,5 ml	625 µl
TEMED	7,5 µl	2,5 µl
10 % APS	75 µl	25 µl

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben zusammen mit einem definierten Proteinstandard auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer bei 30 mA und ca. 180 V für 60 – 90 Minuten bei Raumtemperatur.

5.6.5 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page wurden die Proteinbanden über das Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Schwenken in 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit dem SDS-Gel in mit Transferpuffer getränktem Whatmanpapier eingebettet (je 4 Lagen Whatmanpapier oberhalb und

unterhalb). Die Luftblasen wurden entfernt und die Proteine je nach Proteingröße für 20-40 Minuten bei ca. 30 V und 300 mA auf die PVDF-Membran transferiert.

Im Anschluss an das Blotverfahren wurde die Membran zum Absättigen freier Bindungsstellen für eine Stunde in 15 ml Blockierungslösung (5% Milchpulver in TBST-T) geschwenkt. Zur Detektion von Proteinen mit c-Myc-Tag erfolgte die Inkubation mit einem anti-c-Myc-HRP Antikörper unter Schwenken bei 4°C über Nacht (Antikörperverdünnung 1:5000 in Blockierungslösung).

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit je 15 ml TBS-T für 10 min gewaschen. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte im Anschluss über Chemilumineszenz. Hierzu wurden je 2,5 ml beider Lösungen (Enhanced Luminol Reagent und Oxidizing Reagent) eines Western Lightning™ Plus ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate Kits gemischt und auf die Membran gegeben. Zur Detektion wurden Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Filme benutzt. Die Belichtung der Filme erfolgte je nach Signalstärke unterschiedlich lang.

5.7 Tierexperimentelle Methoden

Für alle Experimente wurden 6 Wochen alte Mäuse, gezüchtet im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover, verwendet. Die Versuche mit subkutanen Tumoren erfolgten ausschließlich in C57Bl/6J Mäusen, während die Versuche mit orthotopen Tumoren der Leber mit p53fl/fl-Mäusen durchgeführt wurden.

Die Haltung der Tiere erfolgte im Sicherheitsbereich S1 in Polycarbonat-Käfigen des Typs II mit bis zu 6 Tieren pro Käfig. Im Sicherheitsbereich S2 erfolgte die Haltung von bis zu 5 Tieren pro Käfig in IVC (individuell belüfteten) Käfigen (Typ T22 Duracage). Alle Tiere wurden auf staubfreiem Einstreu, bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem Tag-/Nachtrhythmus von 14 h/10 h gehalten. Verfüttert wurde steriles pelletiertes Futter der Firma Altronin (Haltungsfutter Maus/Ratte, Alleinfuttermittel; Zusammensetzung: Gesamtprotein 19%, Fett 4%, N-freie Extraktstoffe 50,5%), steriles Wasser erhielten die Tiere über eine Trinkflasche. Die Tierräume befanden sich je nach Sicherheitsstufe (S1/S2) hinter entsprechenden Infektionsbarrieren und wurden regelmäßig gemäß GV-Solas-Liste auf Erreger untersucht. Die Tötung von Tieren erfolgte unter CO₂-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation. Im Rahmen der Arbeit erfolgten alle Tierversuche gemäß der Tierversuchsanträge 12/0978, 15/1874 und 16/2376

5.7.1 Mausstämme

C57Bl/6J: Immunkompetenter Inzuchtstamm; In der Arbeit verwendet zur Etablierung und Therapie subkutaner Tumore und Lungenmetastasen

p53fl/fl (B6.129P2-Trp53^{TM1Brn}/J): Immunkompetenter Inzuchtstamm auf der Basis der C57Bl/6J-Mauslinie. Enthält flankierende LoxP-Sites um das Tumorsuppressorgen p53, um dieses mittels der Cre-Rekombinase gezielt zu deletieren; hier als durchgängig als p53fl/fl bezeichnet

5.7.2 Immunisierung gegen Adenovirus

Zur Induktion Virus-spezifischer Immunantworten mit besonders intensiver humoraler Antwort wurden die Mäuse durch zweifache Injektion von 1×10^9 infektiösen Partikeln hTertAd in 100 μ l isotonischer Kochsalzlösung intravenös (i.v.) immunisiert. Die Injektionen erfolgten im Abstand von 7 Tagen.

5.7.3 Etablierung von Lungenmetastasen

Zur Etablierung von Lungenmetastasen wurden je Maus 3×10^5 Zellen (CMTpSia) in 200 μ l 0,9 % NaCl i.v. injiziert.

5.7.4 Etablierung und Volumenbestimmung subkutaner Tumore

Subkutane Tumore wurden durch Injektion von 1×10^7 Tumorzellen in 150 μ l PBS in die Flanke der Tiere etabliert. Das Tumolvolumen wurde durch die Messung der Länge (L) sowie Breite (B) unter Verwendung folgender Formel ermittelt: $V = L \times B^2 \times \frac{1}{2}$

5.7.5 Intratumorale Virotherapie

Onkolytische Virotherapie subkutaner Tumore erfolgte 6 Tage nach Tumorinokulation durch intratumorale (i.t.) Injektion von 1×10^9 iP hTertAd in 30 μ l isotonischer Kochsalzlösung.

5.7.6 Adaptertherapie

Adaptertherapie erfolgte i.t. oder i.v. mit 50 μ g aufgereinigtem Adapter in 50 μ l (i.t.) bzw. 100 μ l (i.v.) isotonischer Kochsalzlösung.

5.7.7 Immuncheckpointblockade

Immuncheckpointblockade wurde durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 75 μ g des α -PD-1 Antikörpers RMP1-14 in 150 μ l isotonischer Kochsalzlösung zweimal wöchentlich erzielt.

5.7.8 *In vivo* Depletion von Immunzellen

Zur Depletion der NK-Zellen bzw. der CD8-Zellen erhielten Tiere zweimal wöchentlich i.p. Injektionen mit 25 μ g des depletierenden Antikörpers PK136 gegen NK1.1 bzw. 75 μ g des depletierenden Antikörpers 116-13.1 gegen CD8 in jeweils 150 μ l 0,9 %-NaCl-Lösung. Bei Kodepletion beider Immunzelltypen wurden je 25 μ g α -NK1.1 und 75 μ g α -CD8 in insgesamt 150 μ l 0,9 NaCl-Lösung i.p. zweimal die Woche injiziert.

Zur Depletion von Makrophagen und dendritischen Zellen wurden 200 µl Clodronat-Liposomen (5 mg/ml) i.p. zweimal die Woche injiziert.

5.7.9 Blutentnahme

Blutentnahme aus der Vena facialis

Die Blutentnahme am lebenden Tier erfolgte durch Punktierung der Vena facialis mit einer Kanüle (G21, 0,8 mm).

Blutentnahme aus dem Herzen

Finale Blutentnahme erfolgte aus dem Herzen. Hierfür wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Die rechte Herzkammer wurde mit einer 1 ml Spritze mit G26 (0,45 mm) Kanüle punktiert und das Blut entnommen.

5.7.10 Induktion von Lebertumoren mittels *in situ* Elektroporation

Die Induktion von orthotopen Lebertumoren in der Maus erfolgte durch *in situ* Elektroporation von Plasmiden in das Lebergewebe und stabiler Integration der Gensequenzen durch das Sleeping Beauty Transposase System.

Zur Induktion aggressiv und invasiv wachsender Tumore wurden Transposonvektoren codierend für das Onkogen Kras^{G12V} und konstitutiv aktives Akt1 genutzt. Zur Etablierung PolySia-positiver Tumore wurde ein (Transposon-) Vektor genutzt, in dem die Expression von Kras^{G12V} an die Expression der murinen Polysialyltransferase gekoppelt ist (pT-pSia2AKras). Die Koelektroporation eines Plasmides codierend für die Sleeping Beauty Transposase (pSB13) ermöglichte die stabile Integration in das elektroporierte Gewebe. Die Elektroporation erfolgte zudem ausschließlich in Mäusen mit von LoxP-Sequenzen flankiertem p53-Gen (p53fl/fl (B6.129P2-Trp53^{TM1Brn/J})). Die Erweiterung des Ansatzes um ein Konstrukt codierend für die Cre-Rekombinase (pCre) führte dabei zur Deletion des Tumorsuppressorgens p53 in den elektroporierten Zellen.

Tabelle 5.16: DNA-Ansatz für die Tumorinduktion mittels *in situ* Elektroporation

DNA	Volumen
pT-pSia2AKras	8 µl
pCre	8 µl
pSB13	8 µl
pTmyrAkt1	8 µl
TE pH 8	18 µl

Für die Elektroporation wurden die Mäuse narkotisiert (durch i.p. Injektion von 100 µg/kg KGW Ketamin und 10 mg/kg KGW Rompun in isotonischer Kochsalzlösung) und im Anschluss die Bauchwand mittig unterhalb des Rippenbogens geöffnet. Der rechte Leberlappen wurde vorsichtig vorgelagert und die DNA (Ansatz siehe Tabelle 5.16) in das Lebergewebe injiziert (27G; 0,4 mm). Anschließend wurde die

Injektionsstelle elektroporiert. Hierbei wurde der Injektionsbereich zwischen den Elektroden plziert und mit jeweils vier elektrischen Pulsen (Spannung: 35 mV; Pulsdauer: 35 ms; Stromstärke: 100-150 mA; Zeitintervall zwischen 2 Pulsen: 500 ms) zweimalig elektroporiert. Im Anschluss wurde das Lebergewebe reponiert und die Bauchhöhle zweimal mit 40°C warmen dest Wasser gespült. Der Bauchraum wurde im Folgenden in 2 Schritten wieder verschlossen. Zunächst wurde das Bauchfell vernäht (Fadenstärke: 6/0) und im Anschluss die äußere Haut (Fadenstärke: 4/0). Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Mäuse auf eine Wärmeunterlage verbracht.

5.7.11 Abbruchkriterien

Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere wurde stetig überwacht, subkutanes Tumorwachstum über Tumor-Volumenbestimmung dokumentiert und das Wachstum von Lebertumoren (nach Elektroporation) durch Palpation unter CO₂-Inhalationsnarkose untersucht. Das Überleben wurde anhand eines festgelegten Scores, zusammengesetzt aus Tumorgröße und Allgemeinzustand der Mäuse, definiert. Dazu zählten bei allen Tieren vor allem Anzeichen einer Verschlechterung des allgemeinen Zustandes: Gewichtsverlust, verändertes Verhalten, verminderte Agilität oder Fellverlust. Zudem wurden Tiere mit subkutanem Tumor nach Überschreitung einer Tumorgröße von 1000 mm³ Gesamtvolumen, einem Ausmaß von mehr als 1500 mm in eine Messrichtung (Länge/Breite/Tiefe) oder beginnender Ulzeration getötet. Ein palpatorisch positiver Tumorbefund bei lebertumortragenden Mäusen mit Hinweis auf eine Tumorgröße von mehr als 1 cm zählte ebenfalls zu den Abbruchkriterien eines Versuchs. Nach Eintritt einer der genannten Abbruchkriterien wurden die Tiere unter CO₂-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet.

5.7.12 Entnahme und Aufbereitung von Gewebeproben

Entnahme von Organen für die Histologie

Zur histologischen Untersuchung von Gewebe wurden postmortal verschiedene Organe und Gewebe entnommen und in 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) für mindestens 24 h bei 4°C fixiert.

Bei der Entnahme der Lunge wurde diese vor Entnahme durch Injektion in die Trachea mit ca. 1,5 ml 4 %PFA gespült und erst im Anschluss entnommen.

Aufbereitung von Zellen aus Tumorgewebe

Zur Präparation von Einzelzellsuspensionen aus Tumorgewebe wurde das Gewebe entnommen, mit dem Skalpell zerkleinert und in 5 ml Tumorverdaumedium (zum Abbau extrazellulärer Strukturen) aufgenommen. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren (5 ml Pipette) wurden die Proben für 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator (225 rpm) inkubiert. Zur Präparation von Tumorzellen für die Zellkultur wurde Tumorverdaumedium mit Dispase verwendet, während zur Präparation von Zellsuspensionen für

Analysen im Durchflusszytometer (FACS) Tumorverdaumedium ohne Dispase benutzt wurde. Nach Verdau wurden die Proben durch ein Nylonsieb gegeben (40 µm) und mit 15 ml RPMI-Medium gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet für FACS-Analysen in RPMI-Medium bzw. für die anschließende Kultivierung in Zellkulturmedium aufgenommen.

Aufbereitung von Splenozyten

Zur Aufbereitung von Splenozyten wurde die Milz entnommen und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein Nylonsieb (40 µm) in ein 50 ml Röhrchen gedrückt. Im Siebverbliebene Milzzellen wurden mit 10 ml RPMI-Medium durchgespült und die Zellen durch Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 1x RBC-Lysepuffer aufgenommen (zur Lyse der Erythrozyten) und für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml RPMI-Medium abgestoppt und die Splenozyten pelletiert (300 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde im Anschluss verworfen, die Zellen in 20 ml DC-Medium aufgenommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen gefiltert (40 µm Nylonsieb). Die Zellsuspension wurde danach auf 2×10^6 Zellen pro ml mit RPMI-Medium + 2 % FCS ++ P/S eingestellt.

Aufbereitung von Blutzellen und Serum

Entnommenes Blut (siehe 5.7.9) wurde zur Aufbereitung des Blutserums in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die zellulären Bestandteile bei 20000 g und 4°C für 15 min pelletiert. Das Serum wurde im Anschluss abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Aufreinigung von Zellen aus dem Blut wurde entnommenes Blut in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml 1x RBC-Lyse-Puffer (zur Lyse der Erythrozyten) gegeben und 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium abgestoppt und die Zellen pelletiert (Zentrifugation bei 300 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in DC-Medium aufgenommen.

5.8 Immunologische Methoden

5.8.1 Antigen-Stimulation von Splenozyten

Zur Analyse Antigen-spezifischer Zellen wurden Splenozyten über Nacht mit spezifischen Antigenen inkubiert. Die Splenozyten wurden nach Isolation aus der Milz (siehe 5.7.12) in eine 24-Well Zellkulturplatte ausgesät ($1,5 \text{ ml} = 3 \times 10^6$ Zellen pro *Well*). Durch Zugabe von Brefeldin A (1:1000, Stock: 5 mg/ml) wurde der Proteintransport aus der Zelle und damit die Sekretion von Zytokinen unterbunden. Die Zellen wurden gleichzeitig mit einzelnen Peptiden (1:1000, Stockkonzentration 2 mg/ml) stimuliert und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle, zur unspezifischen Stimulation der

Zellen, wurde eine PMA/Ionomycin-Mischung (0,05 µg/ml PMA und 2 µg/ml Ionomycin) zu den Zellen gegeben.

5.8.2 Färbung von Zellen mit Fluoreszenzantikörpern für die Analyse im FACS

Färbung von Zellen aus Zellkultur

Zellen aus der Zellkultur (Primärzellen, sowie etablierte Zelllinien) wurden mit Dissoziationspuffer abgelöst, mit Zellkulturmedium abgespült und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 150 g und 4°C für 8 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Antikörperlösung bzw. Adapterlösung aufgenommen. Antikörper wurden hierfür 1:100 in Zellkulturmedium verdünnt, Adapter wurde in einer Konzentration von 5 µg/100 µl eingesetzt. Die Röhrchen wurden gevortext und für 30 min (Antikörperfärbung) bzw. 60 min (Adapterfärbung) bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml Zellkulturmedium gewaschen und Zellen durch erneute Zentrifugation (150 g, 4°C, 8 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen entweder mit einem sekundären Antikörper gefärbt (wie zuvor + anschließendes Waschen und Zentrifugation) oder direkt zur Analyse im FACS in 300 µl Zellkulturmedium aufgenommen.

Färbung von Immunzellen aus Tumorgewebe

Zellen aus aufgereinigtem Tumorgewebe (siehe 5.7.12) wurden in FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in jeweils 100 µl Fc-Rezeptor Blocking Lösung (1:100 Fc-Block in RPMI, zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen) aufgenommen, gevortext und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit 1 ml RPMI gewaschen und die Zellen durch erneute Zentrifugation (300 g, 4°C, 5 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl Antikörperlösung (Antikörper 1:100 in RPMI) aufgenommen, gevortext und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml RPMI gewaschen, zentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min) und zur FACS-Analyse in 300 – 500 µl RPMI aufgenommen.

Färbung von Immunzellen aus Blut

Blutzellen (Aufreinigung siehe 5.7.12) wurden in FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl Antikörperlösung (Antikörper 1:100 in RPMI) aufgenommen, gevortext und für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml RPMI gewaschen, zentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min) und zur FACS-Analyse in 300 µl RPMI aufgenommen.

Färbung von Splenozyten nach Antigenstimulation

Nach Antigenstimulation über Nacht (siehe 5.8.1) wurde die Splenozyten durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei

300 g und 4°C für 5 min pelletiert und für die extrazelluläre Färbung in 100 µl Antikörperlösung (Antikörper 1:100 in RPMI) aufgenommen, gevortext und für 20 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml RPMI gewaschen und erneut zentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Proben kurz gevortext (um das Verklumpen der Zellen zu minimieren) und in 150 µl Fixierungspuffer (Cytotfix/CytoPerm BD, Kit zur Permeabilisierung der Zellmembran) aufgenommen, gevortext und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss zweimal mit jeweils 1 ml 1 x PermWash-Puffer gewaschen, dazwischen erfolgte ein Zentrifugationsschritt (300 g, 4°C, 5 min). Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre Färbung (auf IFN γ) mit jeweils 100 µl Antikörperlösung (Antikörper 1:100 in 1 x PermWash), die Proben wurden gevortext und für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 1 x PermWash gewaschen, pelletiert (300 g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl 1 x PermWash zur FACS-Analyse aufgenommen.

5.8.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Gefärbte Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (FACS Canto II, BD). Hierbei wurden zunächst die lebenden Zellen über die Parameter FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*) und im Anschluss die Einzelzellen über SSC-W (*width*) gegen SSC-A (*area*) identifiziert. Bei der Analyse der Leukozyten wurden im Folgenden die CD45.2 positiven Zellen und bei der Analyse der Lymphozyten die CD90.2 positiven Zellen isoliert und auf weitere Marker untersucht. Beispielhafte Gating-Strategien für Untersuchungen von Immunzellen aus Geweben finden sich in Abbildung

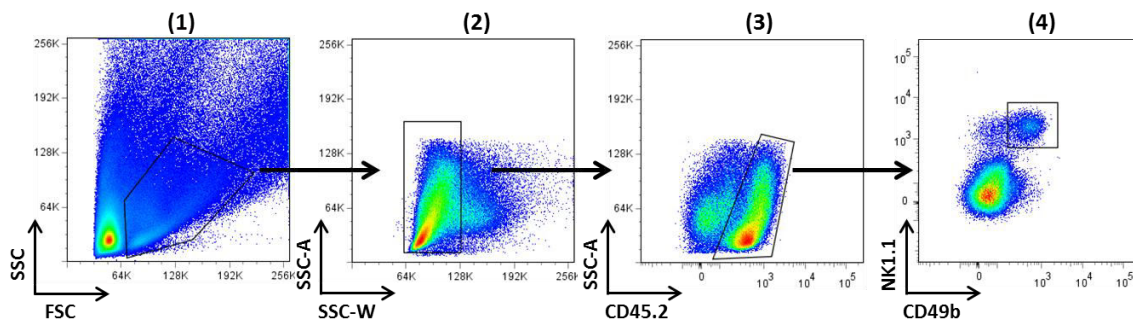


Abbildung 5.2: Gating-Strategie zur Untersuchung von Immunzellen im Durchflusszytometer

Dargestellt sind beispielhafte FACS-Plots zur Veranschaulichung der Strategie zur Identifikation von Immunzellen aus Gewebe. Zunächst wurden über die Auftragung der Parameter SSC und FSC (*sideward* bzw. *forward scatter*) gegeneinander die lebenden Zellen isoliert (1) und im Anschluss im SSC-A (*area*) vs. SSC-W (*width*) auf die Einzelzellen gated (2). Durch Färbung von CD45.2 bzw. CD90.2 mit entsprechenden Antikörpern wurden die Leukozyten bzw. Lymphozyten identifiziert (3) und im Anschluss die Anteile spezifischer Zellpopulationen durch Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern bestimmt (4).

5.9 Histologie

Zur histologischen Analyse von Gewebeproben, wurden Organe wie unter 5.7.12 entnommen und in 4 % PFA fixiert. Im Anschluss wurden die Proben in Gewebekassetten überführt und mit 1 x PBS gewaschen. Die Proben wurden im Einbutter in Paraffin eingebettet (durch Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol und anschließend Paraffin), das Gewebe im Anschluss in Paraffinblöcke eingeschlossen und bei 4°C gelagert.

5.9.1 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die Schnitte im Wasserbad bei ca. 30°C gestreckt und auf einen Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag entparaffiniert. Entparaffinierung von Gewebeschnitten erfolgte durch Inkubation der Objektträger für jeweils 5 Minuten in Xylol und anschließend einer absteigender Ethanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %, 50 %). Danach wurden die Objektträger für 5 min in dest. Wasser inkubiert und entweder einer Hämalaun-Eosin(H/E)-Färbung unterzogen oder immunhistochemisch auf die Expression bestimmter Oberflächenmarker gefärbt.

5.9.2 Hämalaun-Eosin(H/E)-Färbung

Entparaffinierte Schnitte wurden für ca. 30 s in Hämalaun-Lösung zur Färbung des Zellkerns gefärbt, im Anschluss in lauwarmem Wasser gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2 min in Eosinlösung (färbt das Zytoplasma) gefärbt, danach kurz in Wasser und anschließend kurz in Lösungen mit aufsteigender Ethanolkonzentration (40 %, 70 %, 90 %) gespült. Danach wurden die Objektträger für jeweils 5 min zweimal in 100 % Ethanol und danach zweimal in Xylol (Zur Entwässerung der Schnitte) inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte mit Entellan und einem Deckglas eingebettet.

5.9.3 Immunhistochemische Färbung von CD45

Entparaffinierte Schnitte wurden zur Rückgewinnung von Antigenen in einer pH 9 Pufferlösung (Stock 1:10 verdünnt in dest. Wasser) für 20 min bei 96°C gekocht und im Anschluss für weitere 20 min langsam auf ca. 80°C abgekühlt. Im Anschluss wurde endogene Peroxidaseaktivität durch 10-minütige Inkubation in 3 % Wasserstoffperoxidlösung geblockt. Danach wurden die Proben zweimal für 5 min in PBS-Tween (PBS-T) gewaschen und im Anschluss der Primärantikörper (α -mouse CD45) 1:200 in 5 %-Eselserum in PBS-T appliziert. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal in PBS-T gewaschen und im Anschluss der Sekundärantikörper (Biotin α -rat) 1:500 5 %-Eselserum in PBS-T auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h. Die Objektträger wurden erneut zweimal mit PBS-T gewaschen, die Schnitte für weitere 30 min bei Raumtemperatur mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift

(PBS-T) erfolgte die Entwicklung mit DAB-Substrat (3,3'-Diaminobenzidin), sobald eine sichtbare Färbung eintrat wurde die Reaktion durch Waschen mit dest. Wasser abgestoppt. Im Anschluss wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt und die Schnitte mit Faramount Mounting Medium und einem Deckglas eingebettet.

5.10 Statistische Analysen und verwendete Programme

5.10.1 Verwendete Programme

Zur Verarbeitung und Auswertung der FACS-Daten wurde BD FACSDiva™ und FlowJo verwendet. Zur Darstellung der Daten wurde Graphpad Prism 5 und zur Anfertigung histologischer Bilder Leica QWin benutzt. Die Darstellung photometrischer Ergebnisse erfolgte mit Gen 5™ BioTek.

5.10.2 Statistische Analysen

Alle Balkendiagramme und Wachstumskurven zeigen den Mittelwert jeder Gruppe mit entsprechender Standardabweichung (SD). Die statistische Signifikanz beim Vergleich zweier Gruppen wurde über den unpaired student's t-test, two tailed, bestimmt. Beim Vergleich zweier Überlebenskurven wurde der log rank (Mantel-Cox) Test zur Bestimmung der Signifikanz herangezogen. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

6 Literaturverzeichnis

Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Röcken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106, 338–344.

Addeo, A., and Rinaldi, C.R. (2013). Treatment with ipilimumab: A case report of complete response in a metastatic malignant melanoma patient. *Case Rep. Oncol.* 6, 285–288.

Ali, H.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F.M., Liu, B., Shah, M., Earl, H.M., Poole, C.J., Hiller, L., Dunn, J.A., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann. Oncol.* 25, 1536–1543.

Amaro, A., Mirisola, V., Angelini, G., Musso, A., Tosetti, F., Esposito, A.I., Perri, P., Lanza, F., Nasciuti, F., Mosci, C., et al. (2013). Evidence of epidermal growth factor receptor expression in uveal melanoma: Inhibition of epidermal growth factor-mediated signalling by Gefitinib and Cetuximab triggered antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Eur. J. Cancer* 49, 3353–3365.

Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 33, 2780–2788.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.-C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., et al. (2005). CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J. Immunol.* 174, 2591–2601.

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., et al. (2012). ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 40, W597–W603.

Asada, T. (1974). Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 34, 1907–1928.

Atsumi, T., Sato, M., Kamimura, D., Moroi, A., Iwakura, Y., Betz, U.A.K., Yoshimura, A., Nishihara, M., Hirano, T., and Murakami, M. (2009). IFN- γ expression in CD8+ T cells regulated by IL-6 signal is involved in superantigen-mediated CD4+ T cell death. *Int. Immunol.* 21, 73–80.

Au, T., Thorne, S., Korn, W., Sze, D., Kirn, D., and Reid, T. (2007). Minimal hepatic toxicity of Onyx-015: spatial restriction of coxsackie-adenoviral receptor in normal liver. *Cancer Gene Ther.* 14, 139–150.

Bandara, L.R., and La Thangue, N.B. (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351, 494–497.

Bellingan, G.J., Caldwell, H., Howie, S.E., Dransfield, I., and Haslett, C. (1996). In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J. Immunol.* 157, 2577–2585.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shiota, K., and Stanners, C.P. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57, 327–334.

Benedict, W.F., Tao, Z., Kim, C.S., Zhang, X., Zhou, J.H., Adam, L., McConkey, D.J., Papageorgiou, A.,

- Munsell, M., Philopena, J., et al. (2004). Intravesical Ad-IFN γ causes marked regression of human bladder cancer growing orthotopically in nude mice and overcomes resistance to IFN- γ protein. *Mol. Ther.* *10*, 525–532.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* *275*, 1320–1323.
- Beum, P. V., Lindorfer, M.A., and Taylor, R.P. (2008). Within Peripheral Blood Mononuclear Cells, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Rituximab-Opsonized Daudi cells Is Promoted by NK Cells and Inhibited by Monocytes due to Shaving. *J. Immunol.* *181*, 2916–2924.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., et al. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* *274*, 373–376.
- Blair, G.E., Dixon, S.C., Griffiths, S.A., and Zajdel, M.E. (1989). Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Res.* *14*, 339–346.
- Blake, S.J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M.C.R., Mittal, D., Aguilera, A.R., Miles, J.J., Lutzky, V.P., de Andrade, L.F., et al. (2016). Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* *6*, 446–459.
- Blumenthal, R.D., Leon, E., Hansen, H.J., and Goldenberg, D.M. (2007). Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer* *7*, 2.
- Bluming, A., and Ziegler, J. (1971). REGRESSION OF BURKITT'S LYMPHOMA IN ASSOCIATION WITH MEASLES INFECTION. *Lancet* *298*, 105–106.
- Boozari, B., Mundt, B., Woller, N., Strüver, N., Gürlevik, E., Schache, P., Kloos, A., Knocke, S., Manns, M.P., Wirth, T.C., et al. (2010). Antitumoural immunity by virus-mediated immunogenic apoptosis inhibits metastatic growth of hepatocellular carcinoma. *Gut* *59*, 1416–1426.
- Bosslet, K., Steinsträsser, A., Schwarz, A., Harthus, H.P., Lüben, G., Kuhlmann, L., and Sedlacek, H.H. (1988). Quantitative considerations supporting the irrelevance of circulating serum CEA for the immunoscintigraphic visualization of CEA expressing carcinomas. *Eur. J. Nucl. Med.* *14*, 523–528.
- Bourquin, C., von der Borch, P., Zoglmeier, C., Anz, D., Sandholzer, N., Suhartha, N., Wurzenberger, C., Denzel, A., Kammerer, R., Zimmermann, W., et al. (2010). Efficient Eradication of Subcutaneous but Not of Autochthonous Gastric Tumors by Adoptive T Cell Transfer in an SV40 T Antigen Mouse Model. *J. Immunol.* *185*.
- Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2455–2465.
- Breitbach, C.J., Paterson, J.M., Lemay, C.G., Falls, T.J., McGuire, A., Parato, K.A., Stojdl, D.F., Daneshmand, M., Speth, K., Kirn, D., et al. (2007). Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol. Ther.* *15*, 1686–1693.
- Brief, N.I.N. (2016). First Oncolytic Viral Therapy for Melanoma. *Cancer Discov.* *6*, 6–6.
- Brodbeck, T., Nehmann, N., Bethge, A., Wedemann, G., and Schumacher, U. (2014). Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases

- and computer modelling-proven tumKim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., & Yokoyama, W. M. (2000). In vivo natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Cancer* *13*, 244.
- Bruder, J.T., Semenova, E., Chen, P., Limbach, K., Patterson, N.B., Stefaniak, M.E., Konovalova, S., Thomas, C., Hamilton, M., King, C.R., et al. (2012). Modification of Ad5 hexon hypervariable regions circumvents pre-existing Ad5 neutralizing antibodies and induces protective immune responses. *PLoS One* *7*, e33920.
- Budczies, J., Mechtersheimer, G., Denkert, C., Klauschen, F., Mughal, S.S., Chudasama, P., Bockmayr, M., Jöhrens, K., Endris, V., Lier, A., et al. (2017). PD-L1 (CD274) Copy Number Gain, Expression, and Immune Cell Infiltration as Candidate Predictors for Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Soft-Tissue Sarcoma. *Oncoimmunology* *1*, 00–00.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* *13*, 1–27.
- Carlson, C.M., Frandsen, J.L., Kirchhof, N., McIvor, R.S., and Largaespada, D.A. (2005). Somatic integration of an oncogene-harboring Sleeping Beauty transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17059–17064.
- Castle, J.C., Kreiter, S., Diekmann, J., Lower, M., van de Roemer, N., de Graaf, J., Selmi, A., Diken, M., Boegel, S., Paret, C., et al. (2012). Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res.* *72*, 1081–1091.
- Chen, C., Qu, Q.X., Shen, Y., Mu, C.Y., Zhu, Y.B., Zhang, X.G., and Huang, J.A. (2012). Induced expression of B7-H4 on the surface of lung cancer cell by the tumor-associated macrophages: A potential mechanism of immune escape. *Cancer Lett.* *317*, 99–105.
- Cheng, P.-H., Wechman, S., McMasters, K., and Zhou, H. (2015). Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. *Viruses* *7*, 5767–5779.
- Cheung, I.Y., Vickers, A., and Cheung, N.-K. V. (2006). Sialyltransferase STX (ST8SialI): A novel molecular marker of metastatic neuroblastoma. *Int. J. Cancer* *119*, 152–156.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* *6*, 1574–1583.
- Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* *77*, 1303–1310.
- Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., and Lee, P.W.K. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* (80-.). *282*, 1332–1334.
- Coley, W.B. (1891). Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann. Surg.* *14*, 199–200.
- Coley, W.B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 487–511.
- Coley, W.B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.* *3*, 1–48.
- Crawford-Miksza, L., and Schnurr, D.P. (1996). Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J. Virol.* *70*, 1836–1844.

- Czink, E., Kloor, M., Goeppert, B., Froehling, S., Uhrig, S., Weber, T.F., Meinel, J., Sutter, C., Weiss, K.H., Schirmacher, P., et al. (2017). Successful immune checkpoint blockade in a patient with advanced stage microsatellite unstable biliary tract cancer. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* mcs.a001974.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., and Thibault, G. (2004). Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of α FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64, 4664–9.
- Daurkin, I., Eruslanov, E., Stoffs, T., Perrin, G.Q., Algood, C., Gilbert, S.M., Rosser, C.J., Su, L.M., Vieweg, J., and Kusmartsev, S. (2011). Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Res.* 71, 6400–6409.
- Deppisch, N., Ruf, P., Eissler, N., Neff, F., Buhmann, R., Lindhofer, H., and Mocikat, R. (2015). Efficacy and Tolerability of a GD2-Directed Trifunctional Bispecific Antibody in a Preclinical Model: Subcutaneous Administration Is Superior to Intravenous Delivery. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1877–1883.
- Diaconu, I., Cerullo, V., Hirvonen, M.L.M., Escutenaire, S., Ugolini, M., Pesonen, S.K., Bramante, S., Parviainen, S., Kanerva, A., Loskog, A.S.I., et al. (2012). Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* 72, 2327–2338.
- Diamond, B., and Scharff, M.D. (1980). IgG1 and IgG2b share the Fc receptor on mouse macrophages. *J Immunol* 125, 631–633.
- Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G., and Vile, R.G. (2007). Oncolytic Immunovirotherapy for Melanoma Using Vesicular Stomatitis Virus. *Cancer Res.* 67, 2840–2848.
- Diebolder, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.R., et al. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science (80-.).* 343, 1260–1263.
- Diederichsen, A.C.P., Hjelmborg, J.V.B., Christensen, P.B., Zeuthen, J., and Fenge, C. (2003). Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 423–428.
- Dmitriev, I., Kashentseva, E., Rogers, B.E., Krasnykh, V., and Curiel, D.T. (2000). Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J. Virol.* 74, 6875–6884.
- Dock, G. (1904). The influence of complicating diseases upon leukaemia. *Am. J. Med. Sci.* 127, 561–592.
- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Gomez, A.F., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., et al. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 40, 22–35.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 11–22.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998.
- Durbec, P.L., Rougon, G.N., and Figarella-Branger, D.F. (1990). Differential Spectrum of Expression of Neural Cell Adhesion Molecule Isoforms and L1 Adhesion Molecules on Human Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res.* 50, 6364–6370.

- Eggermont, A., Robert, C., Soria, J.C., and Zitvogel, L. (2014). Harnessing the immune system to provide long-term survival in patients with melanoma and other solid tumors. *Oncoimmunology* 3, e27560.
- Endo, T., Toda, M., Watanabe, M., Iizuka, Y., Kubota, T., Kitajima, M., and Kawakami, Y. (2002). In situ cancer vaccination with a replication-conditional HSV for the treatment of liver metastasis of colon cancer. *Cancer Gene Ther.* 9, 142–148.
- Engeland, C.E., Grossardt, C., Veinalde, R., Bossow, S., Lutz, D., Kaufmann, J.K., Shevchenko, I., Umansky, V., Nettelbeck, D.M., Weichert, W., et al. (2014). CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther* 22, 1949–1959.
- Erick, T.K., and Brossay, L. (2016). Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Curr. Opin. Immunol.* 38, 67–74.
- Erwig, L.-P., and Henson, P.M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15, 243–250.
- Falconer, R.A., Errington, R.J., Shnyder, S.D., Smith, P.J., and Patterson, L.H. (2012). Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 12, 925–939.
- Fehérvári, Z., and Sakaguchi, S. (2004). CD4⁺ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest.* 114, 1209–1217.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
- Frietze, K.M., Roden, R.B.S., Lee, J.-H., Shi, Y., Peabody, D.S., and Chackerian, B. (2016). Identification of Anti-CA125 Antibody Responses in Ovarian Cancer Patients by a Novel Deep Sequence-Coupled Biopanning Platform. *Cancer Immunol. Res.* 4, 157–164.
- Frosch, M., Görden, I., Boulnois, G.J., Timmis, K.N., and Bitter-Suermann, D. (1985). NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1194–1198.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K., and Kyritsis, A.P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2–12.
- Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1419–1430.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.
- Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., and Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune

- dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol.* *166*, 5398–5406.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *J. Immunol.* *171*, 1581–1587.
- Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, T., Boulanger, P., and Guillet, J.G. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J. Virol.* *72*, 2388–2397.
- Gahéry-Ségard, H., Juillard, V., Gaston, J., Lengagne, R., Pavirani, A., Boulanger, P., and Guillet, J.G. (1997). Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: Routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. *Eur. J. Immunol.* *27*, 653–659.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* *14*, 1014–1022.
- Galanis, E., Hartmann, L.C., Cliby, W.A., Long, H.J., Peethambaram, P.P., Barrette, B.A., Kaur, J.S., Haluska, P.J., Aderca, I., Zman, P.J., et al. (2010). Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.* *70*, 875–882.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960–1964.
- Gao, Q., Qiu, S.J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.Y., Xiao, Y.S., Xu, Y., Li, Y.W., and Tang, Z.Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* *25*, 2586–2593.
- García-Martínez, E., Gil, G.L., Chaves Benito, A., González-Billalabeitia, E., Angeles, M., Conesa, V., García García, T., García-Garre, E., Vicente, V., and Ayala De La Peña, F. (2014). Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* *16*, 1–17.
- Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., et al. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2018–2028.
- Gascon, E., Vutskits, L., and Kiss, J.Z. (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons. *Brain Res. Rev.* *56*, 101–118.
- Ge, M.Q., Ho, A.W.S., Tang, Y., Wong, K.H.S., Chua, B.Y.L., Gasser, S., and Kemeny, D.M. (2012). NK cells regulate CD8+ T cell priming and dendritic cell migration during influenza A infection by IFN- γ and perforin-dependent mechanisms. *J. Immunol.* *189*, 2099–2109.
- Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., et al. (2004). Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5650–5655.
- Glick, M.C., Livingston, B.D., Shaw, G.W., Jacobs, J.L., and Troy, F.A. (1991). Expression of polysialic acid on human neuroblastoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* *366*, 267–274.

- Gluer, S., Schelp, C., von Schweinitz, D., and Gerardy-Schahn, R. (1998). Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr. Res.* *43*, 145–147.
- Golay, J., Manganini, M., Rambaldi, A., and Introna, M. (2004). Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells. *Haematologica* *89*, 1476–1483.
- Goldman, C.K., Rogers, B.E., Douglas, J.T., Sosnowski, B.A., Ying, W., Siegal, G.P., Baird, A., Campaign, J.A., and Curiel, D.T. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.* *57*, 1447–1451.
- Gong, L., Zhou, X., Yang, J., Jiang, Y., and Yang, H. (2016). Effects of the regulation of polysialyltransferase ST8Siall on the invasiveness and metastasis of small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep.* *37*, 131–138.
- Gu, D.L., Gonzalez, A.M., Printz, M.A., Doukas, J., Ying, W., D'Andrea, M., Hoganson, D.K., Curiel, D.T., Douglas, J.T., Sosnowski, B.A., et al. (1999). Fibroblast growth factor 2 retargeted adenovirus has redirected cellular tropism: Evidence for reduced toxicity and enhanced antitumor activity in mice. *Cancer Res.* *59*, 2608–2614.
- Guidoboni, M., Gafà, R., Viel, A., Doglioni, C., Russo, A., Santini, A., Del Tin, L., Macrì, E., Lanza, G., Boiocchi, M., et al. (2001). Microsatellite Instability and High Content of Activated Cytotoxic Lymphocytes Identify Colon Cancer Patients with a Favorable Prognosis. *Am. J. Pathol.* *159*, 297–304.
- Gujar, S.A., Clements, D., Dielschneider, R., Helson, E., Marcato, P., and Lee, P.W.K. (2014). Gemcitabine enhances the efficacy of reovirus-based oncotherapy through anti-tumour immunological mechanisms. *Br. J. Cancer* *110*, 83–93.
- Gül, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bögels, M., Braster, R., Vidarsson, G., Ten Hagen, T.L.M., Kubes, P., and Van Egmond, M. (2014). Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Invest.* *124*, 812–823.
- Gürlevik, E., Fleischmann-Mundt, B., Armbrecht, N., Longerich, T., Woller, N., Kloos, A., Hoffmann, D., Schambach, A., Wirth, T.C., Manns, M.P., et al. (2013). Adjuvant gemcitabine therapy improves survival in a locally induced, R0-resectable model of metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* *58*, 1031–1041.
- Hallenbeck, P.L., Chang, Y.N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., and Chiang, Y.L. (1999). A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* *10*, 1721–1733.
- Harada, N., Maniwa, Y., Yoshimura, M., Nagata, M., Hamada, H., Yokono, K., and Okita, Y. (2005). E1B-deleted adenovirus replicates in p53-deficient lung cancer cells due to the absence of apoptosis. *Oncol. Rep.* *14*, 1155–1163.
- Häyrinen, J., Haseley, S., Talaga, P., Mühlenhoff, M., Finne, J., and Vliegthart, J.F.G. (2002). High affinity binding of long-chain polysialic acid to antibody, and modulation by divalent cations and polyamines. *Mol. Immunol.* *39*, 399–411.
- Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D., and Kirn, D.H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* *3*, 639–645.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., and Kirn, D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral

efficacy. *Nat. Med.* *6*, 1134–1139.

Hemminki, O., Diaconu, I., Cerullo, V., Pesonen, S.K., Kanerva, A., Joensuu, T., Kairemo, K., Laasonen, L., Partanen, K., Kangasniemi, L., et al. (2012). Ad3-hTERT-E1A, a fully serotype 3 oncolytic adenovirus, in patients with chemotherapy refractory cancer. *Mol Ther* *20*, 1821–1830.

Hernberg, M., Muhonen, T., Turunen, J.P., Hahka-Kemppinen, M., and Pyrhönen, S. (1996). The CD4+/CD8+ ratio as a prognostic factor in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J. Clin. Oncol.* *14*, 1690–1696.

Hersh, E.M., O'Day, S.J., Powderly, J., Khan, K.D., Pavlick, A.C., Cranmer, L.D., Samlowski, W.E., Nichol, G.M., Yellin, M.J., and Weber, J.S. (2011). A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *Invest. New Drugs* *29*, 489–498.

Hildebrandt, H., Mühlenhoff, M., Weinhold, B., and Gerardy-Schahn, R. (2007). Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J. Neurochem.* *103 Suppl*, 56–64.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.

Hoechst, B., Ormandy, L.A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2008). A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Gastroenterology* *135*, 234–243.

Hombach, A., Koch, D., Sircar, R., Heuser, C., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C., and Abken, H. (1999). A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther.* *6*, 300–304.

Hsu, Y.-F., Ajona, D., Corrales, L., Lopez-Picazo, J.M., Gurrpide, A., Montuenga, L.M., and Pio, R. (2010). Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Mol. Cancer* *9*, 139.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., Hsueh, E.C., et al. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* *6*, 17462–17478.

Hubert, P., Heitzmann, A., Viel, S., Nicolas, A., Sastre-Garau, X., Oppezco, P., Pritsch, O., Osinaga, E., and Amigorena, S. (2011). Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Res.* *71*, 5134–5143.

Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. *J. Exp. Med.* *188*.

Imai, M., Landen, C., Ohta, R., Cheung, N.K. V, and Tomlinson, S. (2005). Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res.* *65*, 10562–10568.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* *88*, 577–583.

Ji, R.-R., Chasalow, S.D., Wang, L., Hamid, O., Schmidt, H., Cogswell, J., Alaparthi, S., Berman, D., Jure-Kunkel, M., Siemers, N.O., et al. (2012). An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol. Immunother.* *61*, 1019–1031.

- Johnson, C.P., Fujimoto, I., Rutishauser, U., and Leckband, D.E. (2005). Direct evidence that Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J. Biol. Chem.* *280*, 137–145.
- Juneja, V.R., McGuire, K.A., Manguso, R.T., LaFleur, M.W., Collins, N., Haining, W.N., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* *214*, 895–904.
- Kalyuzhnyi, O., Di Paolo, N.C., Silvestry, M., Hofherr, S.E., Barry, M.A., Stewart, P.L., and Shayakhmetov, D.M. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 5483–5488.
- Kanerva, A., Nokisalmi, P., Diaconu, I., Koski, A., Cerullo, V., Liikanen, I., Tähtinen, S., Oksanen, M., Heiskanen, R., Pesonen, S., et al. (2013). Antiviral and antitumor T-cell immunity in patients treated with GM-CSF-coding oncolytic adenovirus. *Clin. Cancer Res.* *19*, 2734–2744.
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* *479*, 547–551.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* *319*, 675–678.
- Kim, R. (2007). Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. In *Cancer Immunotherapy*, (Wiley-Blackwell), pp. 9–27.
- Kim, E., Kim, J.H., Shin, H.Y., Lee, H., Yang, J.M., Kim, J., Sohn, J.H., Kim, H., and Yun, C.O. (2003). Ad-mTERT-delta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. *Hum Gene Ther* *14*, 1415–1428.
- Kim, J., Kaye, F.J., Henslee, J.G., Shively, J.E., Park, J.G., Lai, S.L., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., and Gazdar, A.F. (1992). Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer* *52*, 718–725.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Arihiro, K. (2006). Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* *66*, 5527–5536.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., and Yokoyama, W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2731–2736.
- Klaus, G.G., Pepys, M.B., Kitajima, K., and Askonas, B.A. (1979). Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology* *38*, 687–695.
- Kleijn, A., Kloezeman, J., Treffers-Westerlaken, E., Fulci, G., Leenstra, S., Dirven, C., Debets, R., and Lamfers, M. (2014). The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PLoS One* *9*, e97495.
- Kleijn, A., van den Bossche, W., Haefner, E.S., Belcaid, Z., Burghoorn-Maas, C., Kloezeman, J.J., Pas, S.D., Leenstra, S., Debets, R., de Vrij, J., et al. (2017). The Sequence of Delta24-RGD and TMZ Administration in Malignant Glioma Affects the Role of CD8 + T Cell Anti-tumor Activity. *Mol. Ther. - Oncolytics* *5*, 11–19.
- Kloos, A., Woller, N., Guerlevik, E., Ureche, C.I., Niemann, J., Armbrrecht, N., Martin, N.T., Geffers, R., Manns, M.P., Gerardy-Schahn, R., et al. (2015). PolySia-specific retargeting of oncolytic viruses triggers

tumor-specific immune responses and facilitates therapy of disseminated lung cancer. *Cancer Immunol Res* 3, 751–764.

Kobayashi, M., Kobayashi, H., Pollard, R.B., and Suzuki, F. (1998). A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J. Immunol.* 160, 5869–5873.

Kobayashi, N., Hiraoka, N., Yamagami, W., Ojima, H., Kanai, Y., Kosuge, T., Nakajima, A., and Hirohashi, S. (2007). FOXP3+ Regulatory T Cells Affect the Development and Progression of Hepatocarcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 13, 902–911.

Kono, K., Kawaida, H., Takahashi, A., Sugai, H., Mimura, K., Miyagawa, N., Omata, H., and Fujii, H. (2006). CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1064–1071.

Kos, F.J., and Engleman, E.G. (1996). Role of Natural Killer Cells in the Generation of Influenza Virus-Specific Cytotoxic T Cells. *Cell. Immunol.* 173, 1–6.

Koski, A., Kangasniemi, L., Escutenaire, S., Pesonen, S., Cerullo, V., Diaconu, I., Nokisalmi, P., Raki, M., Rajacki, M., Guse, K., et al. (2010). Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF. *Mol. Ther.* 18, 1874–1884.

Krasnykh, V.N., Mikheeva, G. V, Douglas, J.T., and Curiel, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* 70, 6839–6846.

Ksienzyk, A., Neumann, B., Nandakumar, R., Finsterbusch, K., Grashoff, M., Zawatzky, R., Bernhardt, G., Hauser, H., and Kröger, A. (2011). IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis. *Cancer Res.* 71, 6410–6418.

Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* 172, 989–999.

Ladwa, R., and Atkinson, V. (2017). The cessation of anti-PD-1 antibodies of complete responders in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 27, 1.

Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J., and Phillips, J.H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* 141, 3478–3485.

Lau, E. (2015). Mismatch repair deficiency predicts benefit of anti-PD-1 therapy. *Lancet. Oncol.* 16, e319.

Lenk, H., Tanneberger, S., Muller, U., Ebert, J., and Shiga, T. (1989). Phase II clinical trial of high-dose recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 24, 391–392.

Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., and Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16013–16018.

Li, H.J., Everts, M., Yamamoto, M., Curiel, D.T., and Herschman, H.R. (2009). Combined transductional untargeting/retargeting and transcriptional restriction enhances adenovirus gene targeting and therapy for hepatic colorectal cancer tumors. *Cancer Res.* 69, 554–564.

Li, X., Wang, P., Li, H., Du, X., Liu, M., Huang, Q., Wang, Y., and Wang, S. (2017). The efficacy of oncolytic adenovirus is mediated by T-cell responses against virus and tumor in Syrian hamster model. *Clin. Cancer Res.* 23, 239–249.

- Lieber, A., He, C.Y., Meuse, L., Schowalter, D., Kirillova, I., Winther, B., and Kay, M.A. (1997). The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J. Virol.* *71*, 8798–8807.
- Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.* *67*, 5064–5066.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.-H., Ye, Y., Sikora, A.G., et al. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell–dependent, tumor antigen–specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1165–1175.
- Liu, Z.X., Govindarajan, S., Okamoto, S., and Dennert, G. (2000). NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J. Immunol.* *164*, 6480–6486.
- Livingston, B.D., Jacobs, J.L., Glick, M.C., and Troy, F.A. (1988). Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *263*, 9443–9448.
- Livingston, P.O., Hood, C., Krug, L.M., Warren, N., Kris, M.G., Brezicka, T., and Ragupathi, G. (2005). Selection of GM2, fucosyl GM1, globo H and polysialic acid as targets on small cell lung cancers for antibody mediated immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *54*, 1018–1025.
- Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* *11*, 237–244.
- Lu, T., Ramakrishnan, R., Altiok, S., Youn, J.-I., Cheng, P., Celis, E., Pisarev, V., Sherman, S., Sporn, M.B., and Gabrilovich, D. (2011). Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 4015–4029.
- Lux, A., Aschermann, S., Biburger, M., and Nimmerjahn, F. (2010). The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, i92–i96.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *29*, 1949–1955.
- Makower, D., Rozenblit, A., Kaufman, H., Edelman, M., Lane, M.E., Zwiebel, J., Haynes, H., and Wadler, S. (2003). Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin. Cancer Res.* *9*, 693–702.
- Mao, Y., Sarhan, D., Steven, A., Seliger, B., Kiessling, R., and Lundqvist, A. (2014). Inhibition of tumor-derived prostaglandin-E2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. *Clin. Cancer Res.* *20*, 4096–4106.
- Matsuzaki, J., Tsuji, T., Chamoto, K., Takeshima, T., Sendo, F., and Nishimura, T. (2003). Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell. Immunol.* *224*, 98–105.
- McKelvey, T., Tang, A., Bett, a J., Casimiro, D.R., and Chastain, M. (2004). T-cell response to adenovirus hexon and DNA-binding protein in mice. *Gene Ther.* *11*, 791–796.
- Mei, J., Xiao, Z., Guo, C., Pu, Q., Ma, L., Liu, C., Lin, F., Liao, H., You, Z., and Liu, L. (2016). Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget* *7*, 34217–34228.

- Miyahara, R., Tanaka, F., Nakagawa, T., Matsuoka, K., Isii, K., and Wada, H. (2001). Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state. *J. Surg. Oncol.* *77*, 49–54.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., et al. (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* *19*, 561–569.
- Moore, A.E., and O'Connor, S. (1950). Further studies on the destructive effect of the virus of russian far east encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer* *3*, 886–890.
- Morel, P.A., Ernst, L.K., and Metes, D. (1999). Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk. Lymphoma* *35*, 47–56.
- Morgan, B. (1999). Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol* *19*, 173–198.
- Morgan, E., Weigle, W., and Hugli, T. (1982). Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *J. Exp. ...* *155*, 1412–1426.
- Morgan, E.L., Thoman, M.L., Hoepflich, P.D., and Hugli, T.E. (1985). Bioactive complement fragments in immunoregulation. *Immunol. Lett.* *9*, 207–213.
- Mota, H.C. (1973). Infantile Hodgkin's Disease: Remission after Measles. *Br. Med. J.* *2*, 421.
- Mulvihill, S., Warren, R., Venook, A., Adler, A., Randlev, B., Heise, C., and Kirn, D. (2001). Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Ther.* *8*, 308–315.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 618–631.
- Muruve, D.A., Barnes, M.J., Stillman, I.E., and Libermann, T.A. (1999). Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum. Gene Ther.* *10*, 965–976.
- Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2008). Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *68*, 2561–2563.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* *13*, 828–835.
- Nakano, K., Orita, T., Nezu, J., Yoshino, T., Ohizumi, I., Sugimoto, M., Furugaki, K., Kinoshita, Y., Ishiguro, T., Hamakubo, T., et al. (2009). Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *378*, 279–284.
- Nakano, O., Naito, Y., Nagura, H., Ohtani, H., Nakano, O., Sato, M., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., et al. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: Clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* *61*, 5132–5136.

- Nakayama, J., Angata, K., Ong, E., Katsuyama, T., and Fukuda, M. (1998). Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. *Pathol Int* *48*, 665–677.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., et al. (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* *60*, 6359–6366.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., et al. (2001). Phase II Trial of Intratumoral Administration of ONYX-015, a Replication-Selective Adenovirus, in Patients With Refractory Head and Neck Cancer. *J. Clin. Oncol.* *19*, 289–298.
- Nemunaitis, J., Tong, A.W., Nemunaitis, M., Senzer, N., Phadke, A.P., Bedell, C., Adams, N., Zhang, Y.-A., Maples, P.B., Chen, S., et al. (2010). A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol. Ther.* *18*, 429–434.
- Nesargikar, P.N., Spiller, B., and Chavez, R. (2012). The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. *2*, 103–111.
- Niemann, J. (2013). Etablierung eines molekularen Adapters zum Retargeting humoraler, virusspezifischer Immunreaktionen gegen solide Tumore. Technische Universität Braunschweig.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* *310*, 1510–1512.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 34–47.
- Ninomiya, T., Akbar, S.M., Masumoto, T., Horiike, N., and Onji, M. (1999). Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *31*, 323–331.
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sato, M., et al. (1999). Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J. Exp. Med.* *190*, 617–627.
- Nosho, K., Dranoff, G., Fuchs, C., and Ogino, S. (2011). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Lab. Investig.* *91*, 160A.
- Nwanegbo, E., Vardas, E., Gao, W., Whittle, H., Sun, H., Rowe, D., Robbins, P.D., and Gambotto, A. (2004). Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *11*, 351–357.
- Onion, D., Crompton, L.J., Milligan, D.W., Moss, P.A.H., Lee, S.P., and Mautner, V. (2007). The CD4+ T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. *J. Gen. Virol.* *88*, 2417–2425.
- Osawa, E., Nakajima, A., Fujisawa, T., Kawamura, Y.I., Toyama-Sorimachi, N., Nakagama, H., and Dohi, T. (2006). Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int. J. Cancer* *118*, 2232–2236.
- Ostrand-Rosenberg, S., Thakur, A., and Clements, V. (1990). Rejection of mouse sarcoma cells after transfection of MHC class II genes. *J. Immunol.* *144*, 4068–4071.

- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 5944–5951.
- Pahl, J.H.W., Ruslan, S.E.N., Buddingh, E.P., Santos, S.J., Szuhai, K., Serra, M., Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C.W., Egeler, R.M., Schilham, M.W., et al. (2012). Anti-EGFR antibody cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells toward osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* *18*, 432–441.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
- Park, B.H., Hwang, T., Liu, T.C., Sze, D.Y., Kim, J.S., Kwon, H.C., Oh, S.Y., Han, S.Y., Yoon, J.H., Hong, S.H., et al. (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* *9*, 533–542.
- Passiglia, F., Bronte, G., Bazan, V., Natoli, C., Rizzo, S., Galvano, A., Listì, A., Cicero, G., Rolfo, C., Santini, D., et al. (2016). PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget* *7*, 19738–19747.
- Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2010). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 238–244.
- Petridis, A.K., Wedderkopp, H., Hugo, H.H., and Maximilian Mehdorn, H. (2009). Polysialic acid overexpression in malignant astrocytomas. *Acta Neurochir. (Wien)*. *151*, 601–603.
- Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garris, C., Pucci, F., Yamazaki, T., Poirier-Colame, V., Newton, A., Redouane, Y., et al. (2016). Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* *44*, 343–354.
- Pihlgren, M., Dubois, P.M., Tomkowiak, M., Sjögren, T., and Marvel, J. (1996). Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J. Exp. Med.* *184*, 2141–2151.
- Piras, F., Colombari, R., Minerba, L., Murtas, D., Floris, C., Maxia, C., Corby, A., Perra, M.T., and Sirigu, P. (2005). The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* *104*, 1246–1254.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 71–78.
- Postow, M.A., Callahan, M.K., and Wolchok, J.D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* *33*, 1974–1982.
- Preston, C.C., Maurer, M.J., Oberg, A.L., Visscher, D.W., Kalli, K.R., Hartmann, L.C., Goode, E.L., and Knutson, K.L. (2013). The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS One* *8*, e80063.
- Prestwich, R.J., Errington, F., Diaz, R.M., Pandha, H.S., Harrington, K.J., Melcher, A.A., and Vile, R.G. (2009). The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum. Gene Ther.* *20*, 1119–1132.
- Puzanov, I., Milhem, M.M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K.S., Anderson, A., Chou, J., et al. (2016). Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *34*, 2619–2626.

- Ramakrishna, E., Woller, N., Mundt, B., Knocke, S., Gurlevik, E., Saborowski, M., Malek, N., Manns, M.P., Wirth, T., Kuhnel, F., et al. (2009). Antitumoral Immune Response by Recruitment and Expansion of Dendritic Cells in Tumors Infected with Telomerase-Dependent Oncolytic Viruses. *Cancer Res.* *69*, 1448–1458.
- Rein, D.T., Breidenbach, M., and Curiel, D.T. (2006). Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol.* *2*, 137–143.
- Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: Influence of tumor origin. *Clin. Cancer Res.* *19*, 4079–4091.
- Reuschenbach, M., Von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 1535–1544.
- Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80-.).* *348*, 124–128.
- Roberts, D.M., Nanda, A., Havenga, M.J.E., Abbink, P., Lynch, D.M., Ewald, B.A., Liu, J., Thorner, A.R., Swanson, P.E., Gorgone, D.A., et al. (2006). Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* *441*, 239–243.
- Van Rooij, N., Van Buuren, M.M., Philips, D., Velds, A., Toebes, M., Heemskerk, B., Van Dijk, L.J.A., Behjati, S., Hilkmann, H., El Atmioui, D., et al. (2013). Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J. Clin. Oncol.* *31*, e439–e442.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., White, D.E., and Steinberg, S.M. (1998). Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann. Surg.* *228*, 307–319.
- Roth, J., Zuber, C., Wagner, P., Taatjes, D.J., Weisgerber, C., Heitz, P.U., Goridis, C., and Bitter-Suermann, D. (1988). Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 2999–3003.
- Ruby, C.E., and Weinberg, A.D. (2009). The effect of aging on OX40 agonist-mediated cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 1941–1947.
- Russell, S.J., and Peng, K.W. (2007). Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 326–333.
- Rux, J.J., Kuser, P.R., and Burnett, R.M. (2003). Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *J. Virol.* *77*, 9553–9566.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4 + Regulatory T Cells for Immunologic Self -Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 531–562.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Pnas* *102*, 18538–18543.
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.-T., Berman, D.M., and Wolchok, J.D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III

- Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1889–1894.
- Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C.S., Umansky, V., and Cerwenka, A. (2012). Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J. Immunol.* **189**, 5602–5611.
- Schlößer, H.A., Theurich, S., Shimabukuro-Vornhagen, A., Holtick, U., Stippel, D.L., and Bergwelt-Baildon, M. von (2014). Overcoming tumor-mediated immunosuppression. *Immunotherapy* **6**, 973–988.
- Schmitz, H., Wigand, R., and Heinrich, W. (1983). Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am. J. Epidemiol.* **117**, 455–466.
- Schreiber, S.C., Giehl, K., Kastilan, C., Hasel, C., Mühlenhoff, M., Adler, G., Wedlich, D., and Menke, A. (2008). Polysialylated NCAM Represses E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion in Pancreatic Tumor Cells. *Gastroenterology* **134**, 1555–1566.
- Seidel, U.J.E., Schlegel, P., and Lang, P. (2013). Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front. Immunol.* **4**, 76.
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Johnston, R.J., Lu, L.-S., Han, M., Thudium, K., Yao, D., Quigley, M., Valle, J., Wang, C., et al. (2016). Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies, and Cynomolgus Macaque Toxicology. *PLoS One* **11**, e0161779.
- Seliger, B., Ritz, U., Abele, R., Bock, M., Tampé, R., Sutter, G., Drexler, I., Huber, C., and Ferrone, S. (2001). Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* **61**, 8647–8650.
- Senzer, N.N., Kaufman, H.L., Amatruda, T., Nemunaitis, M., Reid, T., Daniels, G., Gonzalez, R., Glaspy, J., Whitman, E., Harrington, K., et al. (2009). Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5763–5771.
- Serafini, P., Borrello, I., and Bronte, V. (2006). Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 53–65.
- Serafini, P., Mgebrouff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* **68**, 5439–5449.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111.
- Sharma, P., and Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy.
- Shayakhmetov, D.M., Li, Z.-Y., Ternovoi, V., Gaggar, A., Gharwan, H., and Lieber, A. (2003). The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J. Virol.* **77**, 3712–3723.
- Shenk, T.E. (1996). *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., et al. (2012). Impaired IFN- γ production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* **72**,

5188–5197.

Skillings, J., Wierzbicki, R., Eisenhauer, E., Venner, P., Letendre, F., Stewart, D., and Weinerman, B. (1992). A phase II study of recombinant tumor necrosis factor in renal cell carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Immunother* *11*, 67–70.

Smith, R.R., Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E., and Thomas, L.B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* *9*, 1211–1218.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E.A., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* *191*, 661–668.

Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S.L.H. Van, Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* *42*, 501–510.

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J.M., Desrichard, A., Walsh, L.A., Postow, M.A., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *371*, 2189–2199.

Sodeur, S., Ullrich, S., Gustke, H., Zangemeister-Wittke, U., and Schumacher, U. (2009). Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett.* *282*, 146–151.

Sorrentino, C., Miele, L., Porta, A., Pinto, A., and Morello, S. (2015). Myeloid-derived suppressor cells contribute to A2B adenosine receptor-induced VEGF production and angiogenesis in a mouse melanoma model. *Oncotarget* *6*, 27478–27489.

Sosman, J.A., Fisher, S.G., Kefer, C., Fisher, R.I., and Ellis, T.M. (1994). A phase I trial of continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *5*, 447–452.

Srivastava, R.M., Lee, S.C., Andrade Filho, P.A., Lord, C.A., Jie, H.-B., Davidson, H.C., Lopez-Albaitero, A., Gibson, S.P., Gooding, W.E., Ferrone, S., et al. (2013). Cetuximab-Activated Natural Killer and Dendritic Cells Collaborate to Trigger Tumor Antigen-Specific T-cell Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1858–1872.

Stojdl, D., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* *6*, 821–825.

Sumida, S.M., Truitt, D.M., Lemckert, A.A.C., Vogels, R., Custers, J.H.H. V, Addo, M.M., Lockman, S., Peter, T., Peyerl, F.W., Kishko, M.G., et al. (2005). Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J. Immunol.* *174*, 7179–7185.

Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., and Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1018–1028.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells in Tumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor Immune Activity. *Clin. Cancer Res.* *11*, 6713–6721.

Svane, I.M., Engel, A.M., Nielsen, M.B., Ljunggren, H.G., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1996). Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1844–1850.

Swartz, M.A., and Lund, A.W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 210–219.

Takamori, S., Toyokawa, G., Takada, K., Shoji, F., Okamoto, T., and Maehara, Y. (2017). Combination Therapy of Radiotherapy and Anti-PD-1/PD-L1 Treatment in Non-Small-cell Lung Cancer: A Mini-review. *Clin. Lung Cancer*.

Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yanagihara, K., Nakayama, J., Fujimoto, I., Ikenaka, K., et al. (2000). Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *60*, 3072–3080.

Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yanagihara, K., Inui, K., Oyanagi, H., Yamada, T., et al. (2001). Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *61*, 1666–1670.

Tanaka, K., Hayashi, H., Hamada, C., Houry, G., and Jay, G. (1986). Expression of major histocompatibility complex class I antigens as a strategy for the potentiation of immune recognition of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 8723–8727.

Taqi, A.M., Abdurrahman, M.B., Yakubu, A.M., and Fleming, A.F. (1981). REGRESSION OF HODGKIN'S DISEASE AFTER MEASLES. *Lancet* *317*, 1112.

Taylor, A.W. (1953). Effects of glandular fever infection in acute leukaemia. *Br. Med. J.* *1*, 589–593.

Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med.* *55*, 329–333.

Toda, M., Iizuka, Y., Kawase, T., Uyemura, K., and Kawakami, Y. (2002). Immuno-viral therapy of brain tumors by combination of viral therapy with cancer vaccination using a replication-conditional HSV. *Cancer Gene Ther.* *9*, 356–364.

Todo, T., Rabkin, S.D., Chahlavi, A., and Martuza, R.L. (1999). Corticosteroid administration does not affect viral oncolytic activity, but inhibits antitumor immunity in replication-competent herpes simplex virus tumor therapy. *Hum. Gene Ther.* *10*, 2869–2878.

Topalian, S.L., Solomon, D., and Rosenberg, S.A. (1989). Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol.* *142*.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 207–212.

Tosi, D., Valenti, R., Cova, A., Sovenia, G., Huber, V., Pilla, L., Arienti, F., Belardelli, F., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2004). Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. *J. Immunol.* *172*, 5363–5370.

Trouillas, J., Daniel, L., Guigard, M.-P., Tong, S., Gouvernet, J., Jouanneau, E., Jan, M., Perrin, G., Fischer, G., Tabarin, A., et al. (2003). Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. *J. Neurosurg.* *98*, 1084–1093.

Tuve, S., Liu, Y., Tragoolpua, K., Jacobs, J.D., Yumul, R.C., Li, Z.Y., Strauss, R., Hellström, K.E., Disis, M.L.,

- Roffler, S., et al. (2009). In situ adenovirus vaccination engages T effector cells against cancer. *Vaccine* 27, 4225–4239.
- Valim, Y.M.L., and Lachmann, P.J. (1991). The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti NIP antibodies with human Fc regions. *Clin. Exp. Immunol.* 84, 1–8.
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–28.
- Wada, Y., Nakashima, O., Kutami, R., Yamamoto, O., and Kojiro, M. (1998). Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 27, 407–414.
- Waddington, S.N., McVey, J.H., Bhella, D., Parker, A.L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S.M.K., Greig, J.A., Denby, L., et al. (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132, 397–409.
- Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y., and Bluestone, J.A. (1995). Ly-6C is a marker of memory CD8+ T cells. *J. Immunol.* 155, 1873–1883.
- Wang, X., Li, X., Zeng, Y.N., He, F., Yang, X.M., and Guan, F. (2016). Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *Int. J. Mol. Med.* 37, 197–206.
- Weide, B., Martens, A., Zelba, H., Stutz, C., Derhovanessian, E., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Sucker, A., Schilling, B., Schadendorf, D., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. *Clin. Cancer Res.* 20, 1601–1609.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309–319.
- Wiesenfeld, M., O’Connell, M.J., Wieand, H.S., Gonchoroff, N.J., Donohue, J.H., Fitzgibbons Jr., R.J., Krook, J.E., Mailliard, J.A., Gerstner, J.B., and Pazdur, R. (1995). Controlled clinical trial of interferon-gamma as postoperative surgical adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 13, 2324–2329.
- Windbichler, G.H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., Graf, A.H., Kainz, C., Lahodny, J., Denison, U., Müller-Holzner, E., and Marth, C. (2000). Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer* 82, 1138–1144.
- Wirth, T., Zender, L., Schulte, B., Mundt, B., Plentz, R., Lenhard Rudolph, K., Manns, M., Kubicka, S., and Kühnel, F. (2003). A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res.* 63, 3181–3188.
- Woller, N., Knocke, S., Mundt, B., Gürlevik, E., Strüver, N., Kloos, A., Boozari, B., Schache, P., Manns, M.P., Malek, N.P., et al. (2011). Virus-induced tumor inflammation facilitates effective DC cancer immunotherapy in a Treg-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 2570–2582.
- Woller, N., Gürlevik, E., Fleischmann-Mundt, B., Schumacher, A., Knocke, S., Kloos, A.M., Saborowski, M., Geffers, R., Manns, M.P., Wirth, T.C., et al. (2015). Viral Infection of Tumors Overcomes Resistance to PD-1-immunotherapy by Broadening Neoantigenome-directed T-cell Responses. *Mol. Ther.* 23, 1630–1640.
- Yadav, M., Jhunjhunwala, S., Phung, Q.T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T.K.,

- Fritsche, J., Weinschenk, T., et al. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* *515*, 572–576.
- Yang, P., Yin, X., and Rutishauser, U. (1992). Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J. Cell Biol.* *116*, 1487–1496.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H.C., and Wilson, J.M. (1995). Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* *69*, 2004–2015.
- Ye, X., Xu, S., Xin, Y., Yu, S., Ping, Y., Chen, L., Xiao, H., Wang, B., Yi, L., Wang, Q., et al. (2012). Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J. Immunol.* *189*, 444–453.
- Young, A.-M., Archibald, K.M., Tookman, L.A., Pool, A., Dudek, K., Jones, C., Williams, S.L., Pirlo, K.J., Willis, A.E., Lockley, M., et al. (2012). Failure of Translation of Human Adenovirus mRNA in Murine Cancer Cells Can be Partially Overcome by L4-100K Expression In Vitro and In Vivo. *Mol. Ther.* *20*, 1676–1688.
- Yuan, J., Adamow, M., Ginsberg, B.A., Rasalan, T.S., Ritter, E., Gallardo, H.F., Xu, Y., Pogoriler, E., Terzulli, S.L., Kuk, D., et al. (2011). Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 16723–16728.
- Zamarin, D., Holmgaard, R.B., Subudhi, S.K., Park, J.S., Mansour, M., Palese, P., Merghoub, T., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2014). Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med* *6*, 226ra32.
- Zhang, M., He, Y., Sun, X., Li, Q., Wang, W., Zhao, A., and Di, W. (2014). A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J. Ovarian Res.* *7*, 19.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2008). A Critical Role for Type I IFN-dependent NK Cell Activation in Innate Immune Elimination of Adenoviral Vectors In Vivo. *Mol. Ther.* *16*, 1300–1307.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AFP	Alpha-Fetoprotein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderalbumin (bovine serum albumin)
CAR	(Humaner) Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CAR-L	CAR-Leadersequenz
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
CrAds	Konditional-replikationskompetente Adenoviren
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dMMR	Mismatch Reperatur Defizienz
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECB	ELISA-coating Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	humaner Elongationsfaktor-1 alpha Promotor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endotoxin-Removal
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc γ R	Fc gamma Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FGF2	Fibroblasten Wachstumsfaktor
Flt3L	<i>FMS-like tyrosine kinase-3 ligand</i>
FX	Koagulations-Faktor X
GM-CSF	Granulozyten Monozyten stimulierender Faktor
GPC	Glypican
HCC	Hepatozelluläres Karzinom/ Leberkarzinom
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen)
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSV	Herpes simplex Virus
HVR	Hypervariable Region
hTert	humane Telomerase reverse Transkriptase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral

i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IR	Inverted repeats
IRES	internal ribosome entry site
KGW	Körpergewicht
LB	Lysogeny-Broth Medium
LTR	Long terminal repeats
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAC	Membranangriffskomplex
MCS	Multiple cloning site
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (<i>myeloid- derived suppressor cell</i>)
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
Mip1 α	<i>macrophage-inflammatory protein alpha</i>
MOI	Multiplicity of infection
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität-Rate Hoch
MV	Masern Virus
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Neo	Neomycin
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non small cellular lung carcinoma</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein-1
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
PolySia	Polysialinsäure
pRB	Retinoblastomprotein
PSA	Prostata-spezifische Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Puro	Puromycin
Rb	Retinoblastoma
RMS	Rhabdomyosarkom
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SB	Sleeping Beauty
scFv	single chain variable fragment
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>small cellular lung carcinoma</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
ST8SialII	<i>alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2</i>
ST8SialIV	<i>alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4</i>
Stet	Sucrose-Tris-EDTA-Triton
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tumorassoziierter Makrophage
TME	Tumormikromilieu
T-Vec	Talimogene laherparepvec

TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween
TE	Tris-EDTA
TE-EF	Endotoxinfreies TE
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
VV	Vaccinia Virus

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Die Ad5 Hexon Domäne DE1 ist ein Hauptziel anti-adenoviraler IgGs	20
Abbildung 3.2: DE1-Domäne bindet effizient anti-adenovirale IgGs im Kontext eines bispezifischen Adapters	21
Abbildung 3.3: Der Adapter DE1scFvpSia wird von anti-adenoviralen IgG1 und IgG2a Antikörpern erkannt	22
Abbildung 3.4: Spezifische Bindung des Adapters an PolySia-positive Tumorzellen	23
Abbildung 3.5: Intrinsische Expression des Adapters durch PolySia-positive Tumore resultiert in einem verzögerten Tumorwachstum in Ad5-immunisierten Mäusen	25
Abbildung 3.6: Intravenöse Adapterapplikation inhibiert das Wachstum subkutaner Tumore effektiver als intratumorale Applikation	26
Abbildung 3.7: Eine individuelle Gegenüberstellung von Tumoren gleicher Größe zum Therapiezeitpunkt suggeriert eine Korrelation zwischen dem Therapieerfolg und der Tumorgöße zum Zeitpunkt der intravenösen Adapterapplikation	27
Abbildung 3.8: Intravenöse Adaptertherapie resultiert in einem signifikant verlängerten Überleben in unterschiedlichen subkutanen Tumormodellen	29
Abbildung 3.9: Bestätigung der therapeutischen Wirksamkeit des Antikörper- <i>Retargetings</i> in deutlichem Abstand zur Immunisierung	30
Abbildung 3.10: Orthotopes Tumormodell zur Generierung eines PolySia-positiven Primärtumors in der Leber	31
Abbildung 3.11: Adaptertherapie resultiert in einem signifikant verlängerten Überleben in einem aggressiv wachsenden orthotopen Tumormodell der Leber	32
Abbildung 3.12: Bestätigung des Adapterkonzepts durch Generierung eines Adapters gegen eine alternative Zielstruktur	33
Abbildung 3.13: Adaptertherapie im Kontext der alternativen Zielstruktur hCEA inhibiert wirksam das Tumorwachstum	34
Abbildung 3.14: Die Intensität der Leukozyten-Infiltration variiert deutlich zwischen den verschiedenen subkutanen Tumormodellen	35
Abbildung 3.15: Schematischer Versuchsablauf zur Untersuchung tumorinfiltrierender Immunzellen nach Adaptertherapie	35
Abbildung 3.16: NK-Zellen infiltrieren das Tumorgewebe während der frühen Phase der Adaptertherapie	37
Abbildung 3.17: Die Frequenzen an tumorinfiltrierenden MDSCs und Makrophagen sind zum frühen Zeitpunkt der Adaptertherapie unverändert	38
Abbildung 3.18: Das Verhältnis tumorinfiltrierender CD4 und CD8 T-Zellen ist in der initialen Therapiephase unverändert	39
Abbildung 3.19: Tumorinfiltrierende NK-Zellpopulationen sind zum späten Zeitpunkt nach Therapiebeginn nicht verändert	40
Abbildung 3.20: Anteile an tumorinfiltrierenden Makrophagen und immunsuppressive MSCDs sind zum späten Zeitpunkt nach Adaptertherapie erniedrigt	41
Abbildung 3.21: Zum späten Zeitpunkt während der Adaptertherapie verschiebt sich das Verhältnis von CD8 ⁺ /CD4 ⁺ T-Lymphozyten zu Gunsten von CD8 ⁺ T-Zellen	41
Abbildung 3.22: Adaptertherapie unterstützt die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantwort	42
Abbildung 3.23: Depletionsversuche <i>in vivo</i> bestätigen die Beteiligung von NK- und CD8-Zellen am anti-tumoralen Effekt der Adaptertherapie	44

Abbildung 3.24: Die Depletion von NK-Zellen während der Adaptertherapie verhindert die Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellantworten	46
Abbildung 3.25: Tumorinfiltrierende Immunzellen in subkutanen CMTpSia-Tumoren nach Adaptertherapie bestätigen die Ergebnisse aus MC38pSia-Tumoren	47
Abbildung 3.26: Adaptertherapie führt zu einer effektiven Reduktion von CMTpSia-Lungenmetastasen	48
Abbildung 3.27: Bestätigung der therapeutischen Wirkung des Adapters auf CMTpSia-Lungenmetastasen	49
Abbildung 3.28: Die Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und Adapter-vermitteltem <i>Retargeting</i> getriggelter anti-viraler Antikörper ist eine hochwirksame anti-tumorale Therapieform	50
Abbildung 3.29: Analysezeitpunkte während der Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie...	51
Abbildung 3.30: Intratumorale Virotherapie resultiert kurz nach der Behandlung in einer erhöhten Anzahl an NK-Zellen im Tumorgewebe	52
Abbildung 3.31: Die Frequenz tumorinfiltrierender MDSCs und Makrophagen ist kurz nach intratumoraler Virotherapie nicht signifikant verändert	53
Abbildung 3.32: Kurz nach intratumoraler Virotherapie ist das Verhältnis von CD8 zu CD4 T-Zellen nicht verändert.....	53
Abbildung 3.33: Sequenzielle Therapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einer starken Infiltration des Tumorgewebes durch NK-Zellen	55
Abbildung 3.34: Die Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie führt zu einer Abnahme immunsuppressiver MDSCs sowie zu einem deutlichen Anstieg einer nicht myeloiden Gr1 ⁺ Zellpopulation im Tumorgewebe	56
Abbildung 3.35: Die Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in der Zunahme Gr1-positiver CD8 T-Zellen im Tumorgewebe	57
Abbildung 3.36: Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einem zu Gunsten von CD8 T-Zellen verschobenen CD8/CD4 Verhältnis im Tumor	58
Abbildung 3.37: Sequenztherapie aus Viro- und Adaptertherapie resultiert in einer Amplifikation der Virotherapie-induzierten Tumorantigen-spezifischen CD8 T-Zellantwort.....	59
Abbildung 3.38: Versuchsablauf zur Untersuchung einer synergistischen Wirkung von Adaptertherapie und α PD-1 Immuncheckpointblockade	60
Abbildung 3.39: Adaptertherapie als Basis einer PD-1 Immuncheckpointblockade ist einer α PD-1 Monotherapie deutlich überlegen	61
Abbildung 3.40: Adaptertherapie als Basis einer Immuncheckpointblockade resultiert in einer deutlich höheren Frequenz Tumorantigen-spezifischer CD8 T-Zellen in Milz und Blut verglichen zur PD-1 Blockade als Monotherapie	63
Abbildung 3.41: Integration der PD-1 Immuncheckpointblockade in das Behandlungsschema der Sequenz-therapie aus Viro- und Adaptertherapie	65
Abbildung 3.42: PD-1 Immuncheckpointinhibition und Sequenztherapie aus initialer Virotherapie und anschließendem Antikörper- <i>Retargeting</i> haben eine synergistische anti-tumorale Wirkung	65
Abbildung 5.1: CsCl-Gradient mit aufgetrennten Viruspartikelbanden	105
Abbildung 5.2: Gating-Strategie zur Untersuchung von Immunzellen im Durchflusszytometer	118

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1 Verwendete Geräte.....	86
Tabelle 5.2 Verwendete Antikörper.....	87
Tabelle 5.3: Verwendete Peptide.....	88
Tabelle 5.4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	88
Tabelle 5.5: Verwendete Materialien.....	90
Tabelle 5.6: Verwendete Medien.....	91
Tabelle 5.7: Verwendte Kits.....	91
Tabelle 5.8: Verwendete Primer.....	98
Tabelle 5.9: PCR-Ansatz.....	99
Tabelle 5.10: PCR-Cyclerprogramm.....	99
Tabelle 5.11: Liste der PCR-Reaktionen.....	99
Tabelle 5.12: Liagtionsreaktionen.....	100
Tabelle 5.13: Linearisierung von phTertAd.....	104
Tabelle 5.14: Transfektionsansatz.....	104
Tabelle 5.15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel für SDS-Page (Angaben für 1 Gel)....	111
Tabelle 5.16: DNA-Ansatz für die Tumorinduktion mittels in situ Elektroporation.....	114

8 Publikationen und Konferenzbeiträge

Kloos, A., Woller, N., Gurlevik, E., Ureche, C.-I., **Niemann, J.**, Armbrecht, N., Martin, N.T., Geffers, R., Manns, M.P., Gerady-Schahn, R., et al. (2015). PolySia-Specific Retargeting of Oncolytic Viruses Triggers Tumor-Specific Immune Responses and Facilitates Therapy of Disseminated Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 3, 751–763.

Niemann J., Kühnel F.(2017). *Oncolytic viruses: adenoviruses*. Virus Genes. Springer Science+Business Media, LLC 2017

Posterbeiträge:

Niemann J., Woller N., Manns MP., Kubicka S., Gerady-Schahn R., Kühnel F (2016). Retargeting of anti-viral immune responses to solid tumors using bispecific adapters. EACR24 (The 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research), 9.-12. Juli 2016, Manchester. *European Journal of Cancer*, Vol. 61, Juli 2016, S. 123 Nr. 566

Niemann J., Woller N., Brooks J., Kubicka S., Manns MP., Gerady-Schahn R., Kühnel F. (2017). Engaging antiviral antibodies for tumor therapy using bispecific retargeting molecules. 8. Mildred Scheel Cancer Conference, 14.-16. Juni 2017, Bonn

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Julia Niemann
Geburtsdatum und -ort: 5. April 1989 in Hannover

Ausbildung

10/2011 – 11/2013 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig, Vertiefung Zellbiologie; Abschluss: Master of Science
10/2008 – 09/2011 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig, Vertiefung Zellbiologie; Abschluss: Bachelor of Science
2001 – 2008: Besuch des Georg – Büchner – Gymnasiums Seelze mit Abschluss: Abitur
1999 – 2001: Besuch der Orientierungsstufe Hannover – Ahlem
1995 – 1999: Besuch der Grundschule Harenberg, 30926 Seelze – Harenberg

Berufserfahrung

Seit 01/2014 Naturwissenschaftliche Doktorandin an der Medizinischen Hochschule Hannover
04/2011-12/2012 Studentische Hilfskraft am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig

10 Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich sowohl fachlich als auch persönlich während der Zeit meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwinzer für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Markus Kalesse für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Florian Kühnel, für die Übernahme des Erstgutachtens, aber vor allem für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die stetige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Ich danke der gesamten AG Kühnel für die herzliche und freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die ständige und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Ich danke Sarah Knocke und Bettina Fleischmann-Mundt für ihre Geduld, ihre Unterstützung und alles was ich von ihnen lernen durfte. Bettina möchte ich zudem für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und insbesondere für die Hilfe bei der Kommasetzung danken. Norman Woller danke ich für die vielen interessanten wissenschaftlichen Gespräche, Ratschläge und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Amanda Ernst möchte ich für ihre Unterstützung im Labor und ihre Hilfsbereitschaft danken. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Jennifer Brooks für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor sowie ihre Freundschaft darüber hinaus.

Letzendlich möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir während der Zeit meiner Dissertation zur Seite gestanden haben und mich insbesondere zum Ende meiner Arbeit immer wieder ermutigt und unterstützt haben. Hier gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und allen voran meinem Verlobten David, der mich nicht nur unterstützt und ermutigt hat, wenn es nötig war, sondern auch geduldig meine stundenlangen wissenschaftlichen Ausführungen ertragen hat.