

**Steigerung der Effektivität antikörperbasierter
Immuntherapien bei malignen Erkrankungen durch
Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Niklas Baumann

Kiel, 2023

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Axel Scheidig

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Thomas Valerius

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2023

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

Enhancement of epidermal growth factor receptor antibody tumor immunotherapy by glutaminyl cyclase inhibition to interfere with CD47/signal regulatory protein alpha interactions.

Niklas Baumann, Thies Rösner, J. H. Marco Jansen, Chilam Chan, Klara Eichholz, Katja Klausz, Dorothee Winterberg, Kristina Müller, Andreas Humpe, Renate Burger, Matthias Peipp, Denis M. Schewe, Christian Kellner, Jeanette H.W. Leusen, Thomas Valerius. *Cancer Sci*, 2021;112(8):3029-3040

Myeloid checkpoint blockade improves killing of T-acute lymphoblastic leukemia cells by an IgA2 variant of daratumumab.

Niklas Baumann, Christian Arndt, Judith Petersen, Marta Lustig, Thies Rösner, Katja Klausz, Christian Kellner, Miriam Bultmann, Lorenz Bastian, Fotini Vogiatzi, Jeanette H.W. Leusen, Renate Burger, Denis M. Schewe, Matthias Peipp, Thomas Valerius. *Front Immunol*, 2022;13:949140

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie.....	1
1.1.1	Entwicklung von therapeutischen Antikörpern.....	1
1.1.2	Antikörper des IgG- und IgA-Isotyps.....	4
1.1.2.1	Aufbau von IgG1- und IgA2-Antikörpern.....	5
1.1.3	Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper.....	8
1.2	Zielstrukturen auf Tumorzellen.....	13
1.2.1	Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR).....	13
1.2.2	Das Ektoenzym CD38.....	14
1.3	Effektorzellen für Antikörper.....	16
1.3.1	Natürliche Killerzellen.....	16
1.3.2	Monozyten und Makrophagen.....	17
1.3.3	Polymorphkernige Granulozyten.....	18
1.4	Myeloische Immuncheckpoints in der Tumorimmuntherapie.....	19
1.4.1	Die CD47-SIRP α -Interaktion.....	20
1.4.2	Inhibition der CD47-SIRP α -Interaktion als therapeutischer Ansatz.....	23
1.5	Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung der Arbeit.....	25
2.	Material & Methoden.....	27
2.1	Ethikvotum und Einverständniserklärung der Spender.....	27
2.2	Verwendete Materialien.....	27
2.3	Molekularbiologische & biochemische Methoden.....	39
2.3.1	Konstruktion von Expressionsvektoren für CD47-Fusionsproteine.....	39
2.3.2	Plasmidamplifikation und Präparation endotoxinfreier DNA durch bakterielle Transformation.....	41
2.3.3	Affinitätschromatographie.....	42
2.3.4	Größenausschlusschromatographie.....	42
2.3.5	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.3.6	Massenspektrometrische Analysen.....	43
2.3.7	Herstellung von Zelllysaten und Immunblotverfahren.....	44
2.3.8	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) zur Bestimmung der Bindungskapazitäten von CD47-Fusionsproteinen.....	45
2.3.9	Herstellung von Knock-Out-Mutanten mit der CRISPR/Cas-Methode.....	45
2.4	Zellbiologische Methoden.....	46
2.4.1	Zellkultur.....	46
2.4.2	Behandlung von Tumorzellen mit SEN177 oder <i>all-trans</i> Retinsäure (ATRA).....	47
2.4.3	Produktion von CD47-Fusionsproteinen in CHO-S Zellen.....	47

2.4.4	Durchflusszytometrie zum Nachweis von Oberflächenproteinen und Bestimmung der Bindung von Antikörpern	48
2.4.5	Messung des Zellwachstums	48
2.4.6	Isolierung von Effektorzellen, Präparation von humanem Serum aus peripherem Blut und Generierung von Makrophagen	49
2.4.8	Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose	50
2.4.9	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizitäten und komplementabhängige Zytotoxizität in ⁵¹ Chromfreisetzungstests	52
2.5	<i>In vivo</i> -Experimente.....	52
2.6	Statistische Analysen	53
3.	Ergebnisse.....	55
3.1	CD47-SIRPα-Interaktion.....	55
3.1.1	CD47-Expression auf Tumorzellen.....	55
3.1.2	Expression von Fc-Rezeptoren und SIRPα auf myeloischen Zellen.....	56
3.2	Untersuchungen zur Rolle des N-terminalen Pyroglutamats.....	57
3.2.1	Herstellung und Charakterisierung unterschiedlicher CD47-Fusionsproteine.....	58
3.2.1.1	Produktion und biochemische Charakterisierung	58
3.2.1.2	Bindungsverhalten der CD47-Fusionsproteine an rekombinantes und natives SIRPα .	63
3.2.2	Pharmakologische Inhibition der Isoglutaminylyklase in soliden Tumoren	66
3.2.2.1	Einfluss von SEN177 auf die Expression von CD47 und EGFR	67
3.2.2.2	Einfluss auf die CD47-SIRPα-Interaktion	68
3.2.2.3	Einfluss auf die Zellvitalität und direkte Antikörpereffekte	69
3.2.2.4	Einfluss auf die antikörperabhängige komplement- und zellvermittelte Tumorzelleliminierung.....	71
3.2.2.5	Tumorzelleliminierung <i>in vivo</i>	75
3.3	Biologische Blockade der CD47-SIRPα-Achse	79
3.3.1	Eliminierung von T-ALL-Zellen durch myeloische Effektorzellen mit CD38-gerichteten Antikörpern.....	79
3.3.2	Einfluss der genetischen Ablation von CD47 und QPCTL in T-ALL-Zellen auf die antikörperinduzierte zytotoxische Aktivität myeloischer Zellen.....	83
3.3.3	Blockade der CD47-SIRPα-Interaktion mit CD47-Antikörpern	88
3.3.3.1	Einfluss der CD47-Blockade auf die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose von Tumorzellen	88
3.3.3.2	Einfluss der CD47-Blockade auf die antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Lyse von T-ALL-Zellen	92
3.3.4	Behandlung von T-ALL-Zellen mit Retinsäure führt zur gesteigerten Tumorzelleliminierung durch Daratumumab-Varianten in Kombination mit einer CD47-Blockade	93
4.	Diskussion.....	98

4.1	Das Potential von IgA-Antikörpern zur effektiven Aktivierung myeloischer Zellen in der Tumorimmuntherapie	99
4.1.1	Vergleich der IgG- und IgA-vermittelten Rekrutierung	99
4.1.2	Modifikationen von IgA-Antikörpern zur Verbesserung der Serumhalbwertszeit.....	101
4.2	Einfluss der CD47-SIRP α -Interaktionsblockade auf die Aktivierung von myeloischen Zellen in der antikörperbasierten Tumorimmuntherapie.....	102
4.2.1	Die Inhibition der Isoglutaminylyklase.....	103
4.2.2	CD47-SIRP α -Blockade mit CD47-Antikörpern	105
4.2.3	Steigerung der Antigendichte mit ATRA verbessert die antikörperbasierte Tumorzelllyse und Phagozytose	109
4.2.4	Vergleich der methodischen Ansätze zur CD47-SIRP α -Interaktionsblockade	111
4.3	Zukünftige Vorhaben.....	113
5.	Zusammenfassung.....	115
6.	Summary.....	117
7.	Literaturverzeichnis.....	119
8.	Abkürzungsverzeichnis	153
9.	Abbildungsverzeichnis.....	159
10.	Tabellenverzeichnis	161
11.	Anhang.....	162
12.	Eigene Publikationen	166
13.	Kongressbeiträge.....	168
14.	Danksagung	169
15.	Eidesstattliche Erklärung	170

1. Einleitung

1.1 Monoklonale Antikörper in der Tumortherapie

Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems.¹ Im menschlichen Organismus werden die auch als Immunglobuline bezeichneten Proteine in Plasmazellen gebildet und können in fünf unterschiedlichen Formen (Isotypen) vorkommen:

IgA (Subklasse IgA1 und IgA2),

IgD,

IgE,

IgG (Subklasse IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) und

IgM²,

wobei in immuntherapeutischen Anwendungen vor allem der IgG-Isotyp Verwendung findet.

Die Entwicklung diverser monoklonaler Antikörper bzw. Antikörperprodukte als auch die Forschung an alternativen Antikörperisotypen wie IgA2 zur zielgerichteten Therapie unterschiedlichster Erkrankungen hat im Laufe der letzten Jahre immens zugenommen. Neben der chirurgischen Entfernung, Chemo- und Strahlentherapie stellt die antikörperbasierte Immuntherapie eine wichtige Säule in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen dar.

1.1.1 Entwicklung von therapeutischen Antikörpern

Angefangen im Jahr 1986 mit Muromonab-CD3 (OKT3, Abbildung 1), einem murinen gegen humanes CD3 gerichteten monoklonalen Antikörper, der zur selektiven Depletion von T-Zellen bei akuten Transplantationsreaktionen führt, wurde im Jahr 2021 das 100. Antikörperprodukt von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen.³ Neben den traditionellen, nicht-modifizierten Antikörpern kommen mittlerweile auch modifizierte Formate wie bispezifische Antikörper, Antikörper-Toxin-Konjugate oder auch Antikörperfragmente zum Einsatz.³

Mit der Einführung der Hybridomtechnik von Köhler und Milstein im Jahr 1975 wurde der Grundstein der Antikörperproduktion gelegt.⁴ Dabei wurden Mäuse mit Zielstrukturen (Antigenen) immunisiert, so dass eine Immunantwort induziert wird und die murinen B-Zellen Antikörper gegen die Antigene bilden. Nach Entnahme der Maus-Splenozyten und der anschließenden Fusion mit einer Myelomzelllinie (Generierung einer hybriden Zelllinie = Hybridom) kann die Produktion großer Mengen an identischen Antikörpern ermöglicht werden.⁴ Nachteile der dadurch entstehenden vollständig murinen Antikörper, wie beispielsweise Muromonab-CD3, sind die zunehmende Immunogenität im Menschen⁵ und die geringe Effektivität durch eine verminderte Interaktion mit humanen Fc-Rezeptoren.⁶ Aus diesem Grund wurden chimäre Antikörper entwickelt, die eine humane konstante Region und eine murine variable Region besitzen.⁷ Der erste von der FDA zugelassene chimäre Antikörper im Jahr 1994 war Abciximab, ein anti-GPIIb/IIIa Antigen-bindendes Fragment (Fab) zur Inhibition der Thrombozytenaggregation in kardiovaskulären Erkrankungen.⁸ Kurze Zeit später (1997) kam mit Rituximab, einem CD20-gerichteten chimären Antikörper zur Behandlung von non-Hodgkin-Lymphomen, der erste Antikörper mit onkologischer Indikation auf den Markt.⁹

Ein weiterer Fortschritt, der die Zulassungen therapeutischer Antikörper beschleunigte, war die Entwicklung humanisierter Antikörper durch die CDR-Transplantation (CDR = *complementary determining region*).¹⁰ Hierbei befinden sich lediglich nicht-humane CDR-Sequenzen in einem ansonsten humanen Antikörper. Dies ermöglicht eine hohe Zielantigenspezifität und eine ausgeprägte Effektivität im Menschen mit minimaler Immunogenität aufgrund des humanen Anteils.¹⁰ Der erste humanisierte Antikörper, Daclizumab, wurde ebenfalls 1997 von der FDA zugelassen und wird als anti-IL-2-Rezeptor Antikörper zur Prävention von Transplantationsreaktionen eingesetzt.¹¹

Vollständig humane Antikörper konnten erstmals mit der Phagen-Display-Technologie generiert werden. Diese wurde im Jahr 1990 von Sir Gregory P. Winter entwickelt.¹² Durch das Einbringen eines exogenen Gens (z. B. eines humanen Gens kodierend für einen Antikörper) in einen Bakteriophagen kommt es zur Präsentation des Genproduktes, fusioniert an Mantelproteine des Bakteriophagen, auf der Oberfläche und bedingt somit die Ermittlung spezifischer Bindungspartner im *Biopanning*-Prozess.¹³ Adalimumab, ein Antikörper gegen den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) zur Therapie von rheumatoider Arthritis,¹⁴ war der erste vollständig humane Antikörper, der 2002 von der FDA zugelassen wurde.

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung humaner Antikörper ist die Immunisierung transgener Tiere. Hierfür können beispielsweise die Mauslinien *HuMabMouse* und *XenoMouse* herangezogen werden.^{15,16} Bei den genetisch modifizierten Tieren sind die endogenen Sequenzen kodierend für speziesspezifische Immunglobuline mit den humanen Immunglobulin-kodierenden Genen ausgetauscht.¹⁷ Panitumumab, ein EGFR-gerichteter Antikörper zur Therapie des kolorektalen Karzinoms, war hierbei der erste zugelassene (2006) humane Antikörper, der in transgenen Tieren produziert wurde.^{18,19}

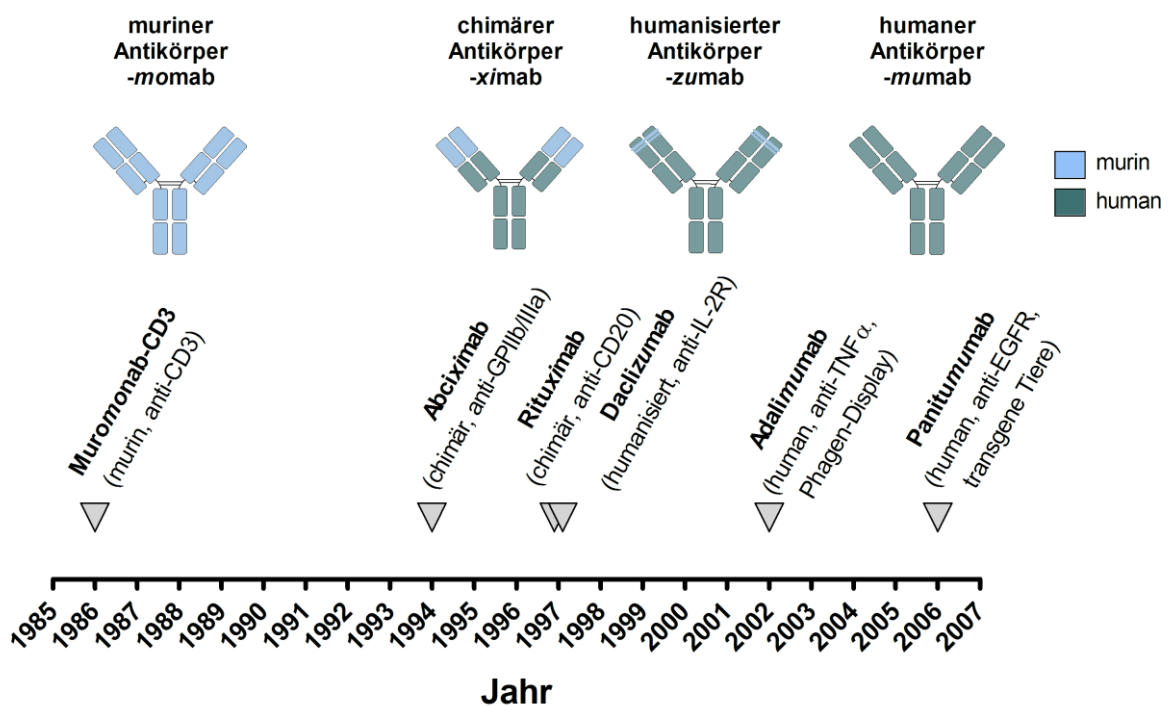


Abbildung 1: Entwicklung traditioneller monoklonaler Antikörper mit Beispielen im zeitlichen Verlauf.

Der erste murine therapeutische Antikörper (Muromonab-CD3) wurde 1986 zugelassen. Es folgte die Entwicklung chimärer Antikörper mit Abciximab als erster zugelassener Antikörper mit murinen variablen Regionen und humanen konstanten Anteilen. Rituximab, ebenfalls ein chimärer Antikörper, war der erste Antikörper zur Therapie von onkologischen Erkrankungen (zugelassen 1997). Im selben Jahr erschien bereits der erste humanisierte Antikörper (Dacizumab), der nur noch murine CDR inkludierte. Im Jahr 2002 kam mit Adalimumab der erste komplett humane Antikörper auf den Markt (erstellt mit der Phagen-Display-Methode). Der ebenfalls zu den humanen Antikörpern zählende Panitumumab konnte 2006 zugelassen werden und wurde in transgenen Tieren produziert.

In der Bekämpfung von Tumoren stellt die Tumormimmuntherapie, im Vergleich zur Chemo- oder Strahlentherapie, eine sehr zielgerichtete Behandlungsmethode dar. Mit 41 zugelassenen Tumor-gerichteten Antikörpern (Stand 2021) können diverse Tumorerkrankungen therapiert werden.³

Nach der Zulassung von Rituximab als erstem tumorspezifischen Antikörper⁹ folgten mit Trastuzumab (1998, anti-HER2-NEU, Mamma-karzinom), Cetuximab (2004, anti-EGFR, Kolonkarzinom), Panitumumab (2006, anti-EGFR, Kolonkarzinom), Ofatumumab (2009, anti-CD20, chronische lymphatische Leukämie), Ipilimumab (2011, anti-CTLA-4, metastasierendes Melanom), Pertuzumab (2012, anti-HER2-NEU, Mammakarzinom), Obinutuzumab (2013, anti-CD20, chronische lymphatische Leukämie) und Daratumumab (2016, anti-CD38, Multiples Myelom)²⁰ weitere wichtige Vertreter in der Therapie von soliden und hämatologischen Tumorerkrankungen.

1.1.2 Antikörper des IgG- und IgA-Isotyps

Antikörper der Klasse IgG sind die vorherrschenden Immunglobuline im Serum und besitzen mit Serumhalbwertszeiten zwischen ca. 7 Tagen (IgG3) und ca. 21 Tagen (IgG1, IgG2 und IgG4)²¹ die längste Halbwertszeit aller Isotypen. Die lange Halbwertszeit der IgG1-, IgG2- und IgG4-Moleküle wird vor allem durch die Bindung an den sogenannten neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) bedingt, der zu einem Recycling der Antikörper führt.²²⁻²⁴

Die Induktion der Effektorfunktionen unterscheidet sich ebenfalls innerhalb der Subklassen. So ist das Immunglobulin G4 als einziger Vertreter der IgG-Moleküle nicht in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren. Zusätzlich unterscheiden sich die Affinitäten der IgGs zu den drei IgG-bindenden Fc-Rezeptoren FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16): während IgG1 und IgG3 an alle drei Fcγ-Rezeptoren binden, interagiert IgG4 mit FcγRI, jedoch nur schwach mit FcγRII und FcγRIII, und IgG2-Moleküle lediglich mit FcγRII.^{25,26}

Aufgrund ihrer langen Halbwertszeit werden IgG-Moleküle, vor allem IgG1 für die Induktion von Effektorfunktionen und IgG2, sofern keine Immunzellrekrutierung gewünscht ist, vorzugsweise in immuntherapeutischen Anwendungen eingesetzt.²⁷

Das Immunglobulin A ist nach IgG am zweitstärksten im Serum vertreten²⁸ und der vorherrschende Antikörper auf Schleimhäuten und in Sekreten, wie z. B. dem Speichel oder der Muttermilch.²⁹ Während bis zu 90 % des im Serum befindlichen IgA die Subklasse IgA1 ausmacht, kommen auf den Schleimhäuten überwiegend IgA2-Moleküle vor, die dort eine essentielle Rolle in der initialen Abwehr von Pathogenen übernehmen.

Der strukturelle Unterschied zwischen IgA1 und IgA2 liegt vor allem in der Gelenkregion. Diese ist bei IgA1 doppelt so lang wie bei IgA2. Serumbeständiges IgA1 kommt vorzugsweise als Monomer, das Schleimhaut-IgA2 als sekretorisches Dimer (sIgA) vor.²⁵ Dabei wird die Ausbildung von sekretorischen Dimeren durch das Vorhandensein der kurzen C-terminalen Peptidkette, dem *tailpiece*, an der C_H3-Domäne begünstigt, an das die J-Kette (engl. *joining chain*) kovalent über Disulfidbrücken (Cystein Position 471) bindet.^{25,30,31} Über den Prozess der Transzytose werden die dimeren IgA-Moleküle nach Bindung der J-Kette an den sogenannten Immunglobulinpolymerrezeptor (engl. *polymeric immunoglobulin receptor*, pIgR) auf der basolateralen Seite von Epithelzellen durch diese transportiert und ins Lumen als sIgA sekretiert. Das sIgA beinhaltet neben der J-Kette eine sekretorische Komponente (engl. *secretory component*, SC), die ein abgespaltenes Fragment des pIgR ist und überwiegend der Stabilität dient.^{32,33}

Neben dem pIgR wurden weitere IgA-bindende Rezeptoren, wie dem Asialoglykoproteinrezeptor, der die Zuckerstrukturen auf IgA-Molekülen erkennt und die Internalisierung in Hepatozyten induziert³⁴, oder dem auf myeloischen Zellen exprimierten Fc α -Rezeptor I (CD89), der zu einer Aktivierung der Immunzellen führt, identifiziert. Obwohl alle IgA-Formen Liganden des CD89 sind, binden freie IgA-Monomere bzw. Dimere nur moderat, während im Vergleich dazu IgA-Immunkomplexe eine starke Interaktion aufzeigen. Die Bindung des sIgA an CD89 ist aufgrund der sekretorischen Komponente sterisch gehemmt, jedoch soll die Bindungskapazität erhöht werden können, sobald der Komplement Rezeptor 3 als Co-Rezeptor fungiert.³⁵

1.1.2.1 Aufbau von IgG1- und IgA2-Antikörpern

Antikörper können je nach Antikörperklasse als Monomere (IgA, IgD, IgE und IgG), Dimere (IgA) oder Pentamere (IgM) vorliegen.^{25,36} Im Rahmen der Arbeit wurden therapeutische IgG, vor allem IgG1-, als auch IgA2-Antikörpermonomere eingesetzt, wobei die IgA2-Moleküle in einer optimierten Variante (IgA2.0) vorlagen, die eine verlängerte Serumhalbwertszeit im Vergleich zur Wildtypvariante aufzeigt.³⁷

Ein IgG1- oder IgA2-Antikörpermonomer besteht aus zwei identischen schweren Ketten (engl. *heavy chain*, HC) und zwei gleichen leichten Ketten (engl. *light chain*, LC) der Typen κ oder λ .

Jede Kette beinhaltet dabei eine N-terminale variable (engl. *variable*, V) Region und eine (bei der LC) oder mehrere (bei der HC) konstante (engl. *constant*, C) C-terminale Regionen.³⁸ Die Größe einer konstanten oder variablen Domäne liegt bei 110 bis 130 Aminosäuren und einer molekularen Masse von ca. 12 – 13 kDa. Es resultieren folglich Massen von durchschnittlich 25 kDa für eine leichte Kette (V_L + C_L) und ca. 55 kDa für eine schwere Kette mit drei konstanten Domänen (V_H + C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}).²⁵

Die Zusammenlagerung einer schweren Kette mit einer leichten Kette wird als Heterodimer (H1L1) bezeichnet, wobei die Ausbildung weiterer Disulfidbrücken in der Gelenkregion (Verbindung zwischen C_{H1} und C_{H2}) die Bildung des charakteristischen Y-förmigen Antikörpers begünstigt.^{25,39}

Grundlegende strukturelle Unterschiede zwischen IgG1- und IgA2-Monomeren sind sowohl die kurze C-terminale Peptidsequenz an der C_{H3}-Domäne bei IgA2-Molekülen, dem *tailpiece*²⁵, als auch unterschiedliche Glykosylierungen.³⁶ Zudem existieren drei IgA2-Alloformen: IgA2m(1), IgA2m(2) und dem weniger charakterisierten IgA2(n)⁴⁰, wobei Strukturanalysen zeigten, dass sich bei der IgA2m(1)-Alloform überwiegend eine T-förmige Struktur ausbildet.⁴¹ Untereinander unterscheiden sich die IgA2-Alloformen ebenfalls geringfügig. Die leichten Ketten beim IgA2m(1) sind im Gegensatz zum IgA2m(2) kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Zusätzlich besitzen IgA2m(2) bzw. IgA2(n) eine weitere N-Glykosylierungsstelle an Position 211.⁴¹

Die *in silico* generierte IgA2.0-Variante basiert auf der IgA2m(1)-Alloform, die jedoch diverse Mutationen trägt. In dem IgA2.0-Molekül wurden zwei Asparaginreste (N166, N337) und zwei Cysteinreste (C311, C472) deletiert, als auch das Prolin an Position 221 mit Arginin ausgetauscht, so dass weniger N-Glykosylierungsstellen vorliegen und es zu einer stabilisierten Verbindung zwischen der leichten und schweren Kette kommt. Zudem reduziert die Deletion des Cysteins an Position 472, das im *tailpiece* liegt, die Ausbildung von dimeren IgA2-Molekülen.³⁷

Der schematische Aufbau von IgG1-, IgA2m(1)-, IgA2m(2)- und IgA2.0-Antikörpermonomeren ist in Abbildung 2 dargestellt.

Funktionell lässt sich der Antikörper in zwei Fragmente unterteilen: die zwei identischen F_{ab}-Fragmente und das F_c-Fragment. Durch ein F_{ab}-Fragment (engl. *fragment of antigen binding*) kommt es zur Antigenbindung über die dort beinhalteten hypervariablen Regionen (CDR). Diese bindenden Bereiche des Antikörpers werden Paratope genannt, während der komplementäre Bindungsbereich des Antigens als Epitop bezeichnet wird.²⁵ Im Gegensatz dazu ist das F_c-Fragment (engl. *fragment crystallizable*) für die Induktion von Effektorfunktionen, genauer gesagt: die Interaktion zwischen Antikörper und Effektorzellen über Fc-Rezeptoren oder der Aktivierung des Komplementsystems, verantwortlich. Des Weiteren wird der Antikörperisotyp durch den konstanten Fc-Teil determiniert.²⁵

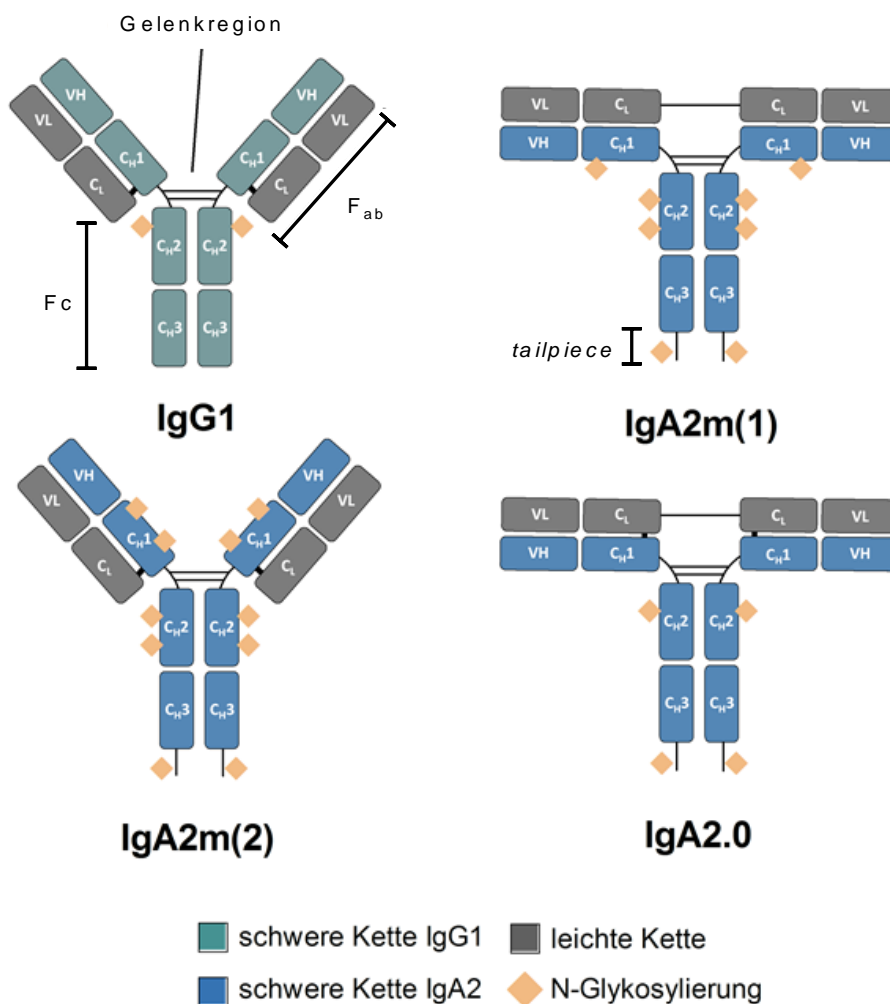


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG1 und monomere IgA2m(1)-, IgA2m(2)- und IgA2.0-Antikörper. Das Antikörpermonomer setzt sich aus zwei jeweils identischen schweren (türkis bei IgG1 oder blau bei IgA2) und zwei leichten (grau) Ketten zusammen. Dabei besitzen beide Ketten jeweils eine variable Region (VH & VL) und eine (C_L) bzw. drei (C_H1-C_H3) konstante Domänen. Die Verknüpfung beider Heterodimere erfolgt über die Gelenkregion. Bindungen des Antigens erfolgen über das F_{ab}-Fragment, während der F_c-Teil die Induktion von Effektorfunktionen begünstigt. Bis auf bei IgA2m(1) sind alle leichten Ketten kovalent mit der schweren Kette verbunden. Eine N-Glykosylierung liegt beim IgG1 an der Position 297 vor. Die Asparaginreste N166, N263, N337, N459 sind beim IgA2m(1) glykosyliert. Zusätzlich besitzt die IgA2m(2)-Alloform eine Abb. 2 ff.

weitere Glykosylierungsstelle an Position N211. Bei der IgA2.0-Variante liegen nur zwei Glykosylierungsstellen und auch eine kovalente Verbindung der leichten und schweren Kette im Vergleich zu IgA2m(1) vor.

1.1.3 Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper können auf diverse Arten wirken, die sich formal in F_{ab}- und Fc-vermittelte Effekte einteilen lassen. Dabei beeinflusst vor allem die Biologie des angesteuerten Tumorzielantigens den Wirkmechanismus des Antikörpers.⁴²

Bei den F_{ab}-vermittelten oder direkten Effekten kann es nach Bindung des Antikörpers an das Antigen auf der Tumorzelle zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) oder zu einer Blockade von Signalwegen, die Zellproliferation bewirken, kommen. Dies ist unter anderem bei dem häufig auf soliden Tumoren überexprimiertem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) der Fall.

Cetuximab und Panitumumab, zwei gegen den EGFR gerichteten monoklonale Antikörper, binden an das Epitop des natürlichen Liganden EGF und verhindern somit die Rezeptor-Liganden-Interaktion. Es resultiert folglich ein Proliferationsarrest der Tumorzelle durch die Blockade der Signaltransduktion und damit einhergehend die Induktion von Apoptose.⁴³

Ein häufig auf hämatologischen Tumoren überexprimiertes Antigen ist CD20, das beispielsweise mit den Antikörpern Rituximab oder Obinutuzumab angesteuert wird.⁴⁴ Rituximab kann nach Bindung unter anderem zu einer Inhibition von anti-apoptotischen Signalwegen führen und somit die Tumorzelle abtöten.⁴⁵ Durch die Bindung von Obinutuzumab kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts und folglich der Induktion des Lysosomen-abhängigen Zelltods.⁴⁶

Neben CD20 sind weitere Zielstrukturen, wie z. B. CD38, auf einer Vielzahl hämatologischer Tumoren exprimiert. Der gegen das Oberflächenprotein CD38 gerichtete monoklonale Antikörper Daratumumab ist in der Lage die Tumorzelle beispielsweise über den programmierten Zelltod durch die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Kreuzvernetzung bei malignen Plasmazellen zu induzieren.^{47,48}

In Abbildung 3 sind die direkten F_{ab}-vermittelten Effekte grafisch zusammengefasst.

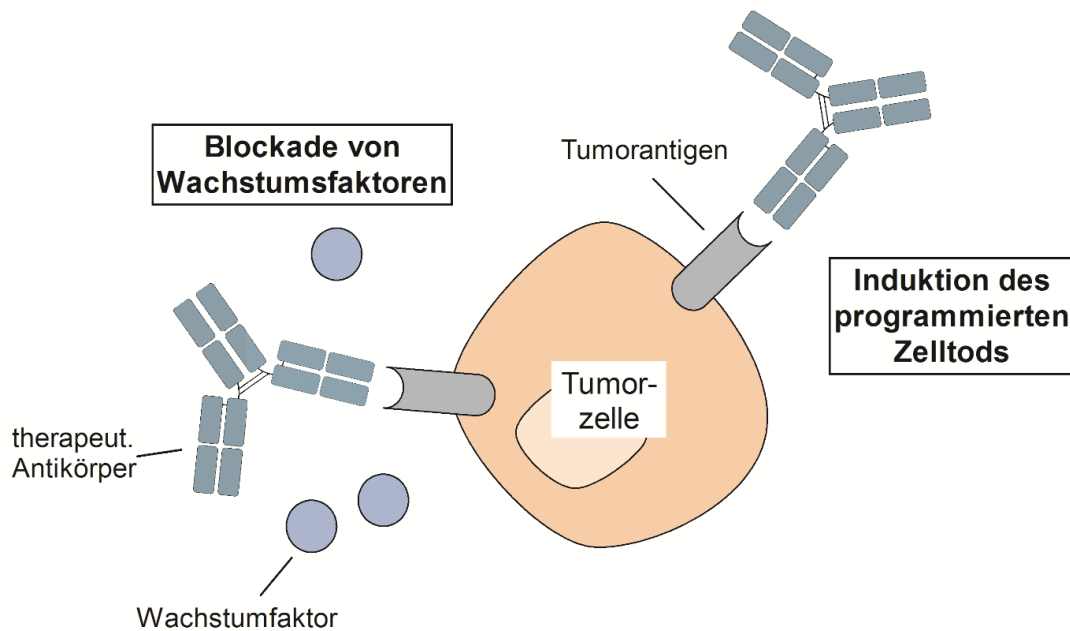


Abbildung 3: Direkte, F_{ab} -vermittelte Effekte monoklonaler Antikörper in der Tumormimmuntherapie.

Zu den direkten Effekten monoklonaler Antikörper zählen die Blockade von Wachstumsfaktoren und der damit einhergehenden Proliferationsinhibition der Tumorzelle. Des Weiteren können therapeutische Antikörper durch die Bindung bestimmter Tumorantigene den programmierten Zelltod induzieren.

Neben den direkten Effekten spielen die indirekten, Fc-vermittelten Wirkmechanismen eine wichtige Rolle in der Tumormimmuntherapie. Hierbei kommt es zur Induktion der komplementabhängigen Zytotoxizität (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC), der antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose (engl. *antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) oder der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann in einer direkten Tumorzellyse resultieren.^{49,50} IgG1- und IgG3-Antikörper, gegen beispielsweise CD20⁵¹, sind potente Aktivatoren des Komplementsystems. Nach Ausbildung des Antikörper-Antigen-Komplexes kommt es zur Bindung der Komplementkomponente 1q (engl. *complement component 1q*, C1q) an den Fc-Teil der Antikörper. Es resultiert die Induktion der Komplementkaskade mit anschließender Formation des Membran-Attackierungs-Komplexes, der zu einer Tumorzellyse führt.^{49,52}

Eine Interaktion der Fc-Teile mit aktivierenden Fc-Rezeptoren auf Immunzellen kann zur antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose bzw. Zytotoxizität führen.⁵³ Hierbei werden vor allem Makrophagen, Monozyten, Neutrophile als auch NK-Zellen rekrutiert.^{54,55}

Während NK-Zellen als aktivierenden Fc-Rezeptor lediglich den IgG-bindenden FcγRIIIa (CD16a) exprimieren, kommen auf den myeloischen Zellen (hier Monozyten, Makrophagen, Neutrophile) die aktivierenden, IgG-bindenden Fc-Rezeptoren FcγRI (CD64), FcγRIIIa (CD32a) und der IgA-bindende FcαRI (CD89) vor. Makrophagen besitzen zusätzlich FcγRIIIa. Auch eine Inhibition von Immunzellen kann über Fc-Rezeptoren erfolgen: so wird der inhibitorische Rezeptor FcγRIIb (CD32b) zur Bindung von IgG-Molekülen auf Monozyten und Makrophagen exprimiert. Des Weiteren wird der sogenannte *decoy*-Rezeptor FcγRIIIb (CD16b, ebenfalls IgG-bindend), der keine intrazelluläre Signalkaskade induziert, auf Neutrophilen exprimiert.⁵⁶

Die intrazelluläre Signaltransduktion zur Aktivierung von Effektorzellen erfolgt durch ITAMs (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) bzw. über ITIMs (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) bei der Inhibition.⁵⁷ Nach Bindung der Antikörper mit dem Fc-Teil an aktivierende Fc-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der assoziierten Src-Kinasen Lyn bzw. Fyn mit einer anschließenden Phosphorylierung zweier konservierter Tyrosinreste. Es folgt die Rekrutierung und Aktivierung der Syk-Kinase über die SH2-Domäne, wodurch die Phosphorylierung zellspezifischer Substrate wie Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI 3-K), Phospholipasen C_γ (PLC_γ) und LAT (engl. *linker for activation of T cells*) begünstigt wird.⁵⁷

Die zur Abtötung von Tumorzellen zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden sich je nach Effektorzellpopulation. Während Makrophagen die Tumorzellen nach Rekrutierung über aktivierende Fc-Rezeptoren phagozytieren^{58,59}, können Neutrophile die maligne Zelle über die sogenannte Trophoptose eliminieren. Hierbei werden Fragmente aus der Tumorzellmembran durch die Phagozyten über einen aktiven Membranaustausch entfernt, bis diese ihre Integrität verliert und die Tumorzelle abstirbt.^{60,61} Im Gegensatz zu den Neutrophilen setzen NK-Zellen nach antikörpervermittelter Aktivierung zytotoxische Moleküle wie Perforine und Granzyme frei, die zu einer Lyse der Tumorzelle führt.⁶²

Die Induktion der antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose über Makrophagen konnte für IgG-Antikörper gegen den EGF-Rezeptor auf soliden Tumorzellen⁶³ und gegen CD20⁴⁵ oder CD38⁶⁴ auf hämatoonkologischen Zellen gezeigt werden. Neben der ADCP ist die Induktion der ADCC ein wichtiger Wirkmechanismus in der Tumormimmuntherapie.⁶⁵ Neutrophile sind in der Lage solide als auch hämatologische Tumorzellen durch ADCC zu töten.

Unter Einsatz der EGFR-gerichteten Antikörper Cetuximab (IgG1) oder Panitumumab (IgG2) lassen sich solide Tumorzellen eliminieren, wobei die IgG2-Moleküle stärkere Effekte induzieren.⁶⁶ Obwohl IgA-Moleküle klinisch noch nicht eingesetzt werden, konnten Valerius et al. erstmals zeigen, dass die Aktivierung des IgA-bindenden Rezeptors Fc α RI zu einer Neutrophilen-vermittelten Eliminierung von Tumorzellen führt.⁶⁷ Ein Isotypwechsel von Cetuximab zu Cetuximab-IgA2 führte im Vergleich zu IgG-Molekülen zu einer effektiveren Aktivierung von Neutrophilen *in vitro*.⁶⁸ Auch in *in vivo*-Versuchen konnten EGFR-gerichtete IgA2-Moleküle eine effektive Reduktion der Tumorzelllast bewirken.⁶⁹

Obwohl die präklinischen Daten vielversprechende Erfolge erzielten, haben IgA-Moleküle im Gegensatz zu IgG-Antikörpern bis zum heutigen Tag noch keinen therapeutischen Einsatz. Dies liegt unter anderem an der kurzen Serumhalbwertszeit des IgA1 und IgA2.⁷⁰ Eine Fc-optimierte IgA2-Variante des EGFR-gerichteten Antikörpers Cetuximab konnte jedoch eine verbesserte Pharmakokinetik im Vergleich zur Wildtypvariante erzielen.³⁷ Neben EGFR als Zielstruktur lassen sich unter anderem ebenfalls HER2 auf Mammakarzinomzellen mittels Trastuzumab⁷¹, CD20 bei lymphatischen und leukämischen Tumorzellen über Rituximab, Ofatumumab bzw. Obinutuzumab⁷² oder MHC Klasse II-Moleküle⁷³ auf Lymphomzellen ansteuern. Auch hier zeigte sich, dass IgA-Moleküle den IgG-Molekülen in der Neutrophilen-vermittelten Lyse *in vitro* überlegen waren.^{71,74,75} Aus aktuellen Studien ging zudem hervor, dass IgA-Varianten der CD20 bindenden Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab ebenfalls Makrophagen zur effektiven Phagozytose von hämatologischen Tumorzellen rekrutieren.⁷⁶

Neben den Neutrophilen sind NK-Zellen in der Lage Tumorzellen über die ADCC zu eliminieren. Es wurde beobachtet, dass der Einsatz von EGFR-gerichteten Antikörpern zur Aktivierung von NK-Zellen gegen solide Tumorzellen führt.^{77,78} Zudem konnten auch HER2-exprimierende Mammakarzinomzellen selektiv über eine NK-Zell-vermittelte ADCC eliminiert werden.⁷⁹ Im hämatoonkologischen Bereich lassen sich beispielsweise Lymphomzellen über CD20-gerichtete Antikörper⁸⁰ durch NK-Zellen abtöten.

Eine Induktion der ADCC der meisten zytotoxischen T-Zellen lässt sich im Vergleich zu NK-Zellen oder Neutrophilen nur schlecht über Fc-Rezeptoren verwirklichen. Lediglich die Subpopulation V δ 2 der $\gamma\delta$ -T-Zellen weist mit dem Fc γ RIIIa einen aktivierenden Fc-Rezeptor auf der Oberfläche auf und kann somit vom Einsatz eines therapeutischen IgG1 profitieren.⁸¹ Durch die Entwicklung des CD19xCD3 bispezifischen Antikörpers Blinatumomab lassen sich

jedoch alle T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor aktivieren, so dass eine Bekämpfung von lymphatischen und leukämischen Tumorzellen stattfindet.⁸²

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Fc-vermittelten Effekte zur Bekämpfung von Tumorzellen sind in Abbildung 4 grafisch zusammengefasst.

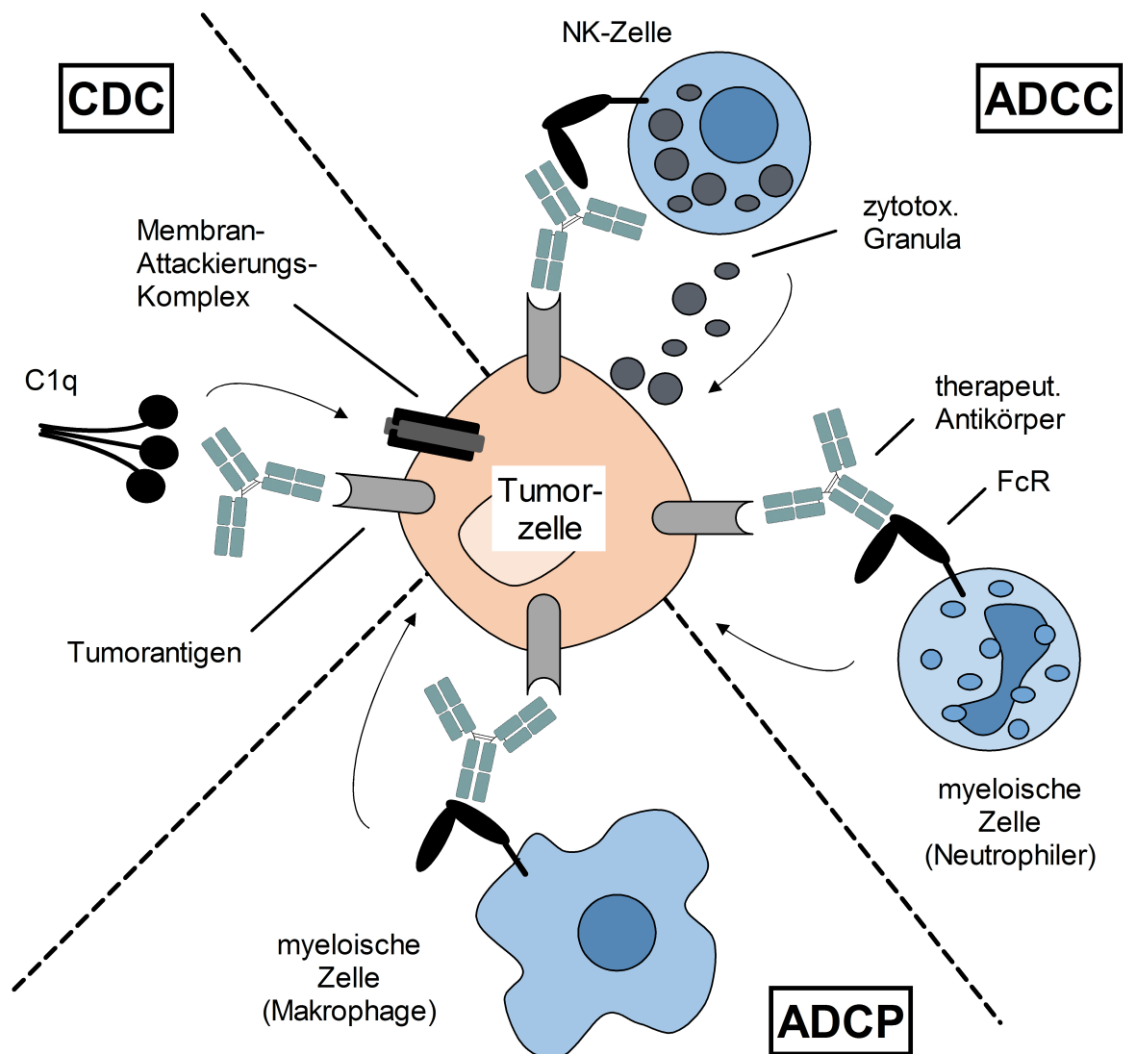


Abbildung 4: Indirekte, Fc-vermittelte Effekte monoklonaler Antikörper in der Tumorimmuntherapie. Zu den Fc-vermittelten Effektormechanismen zählen die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC), die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP). Bei der CDC kommt es nach Bindung des Antikörpers an das Tumorantigen zur Rekrutierung und Bindung des Komplementinitiatorproteins C1q. Die darauffolgende Induktion der Komplementkaskade mündet in der Formation des Membran-Attackierungskomplexes, durch den die Tumorzelle lysiert wird. Eine ADCC kann beispielsweise über NK-Zellen oder myeloische Zellen wie Neutrophile erfolgen. Nach Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle interagiert dieser mit einem aktivierenden Fc-Rezeptor (FcR) auf der Effektorzelle und begünstigt somit die Abtötung der Tumorzelle. Dabei setzen NK-Zellen zytotoxische Granula frei, während Neutrophile die Zielzelle über den Mechanismus der Trophagozytose lysieren. Makrophagen sind in der Lage die Tumorzelle nach Aktivierung über therapeutische Antikörper zu phagozytieren (ADCP).

1.2 Zielstrukturen auf Tumorzellen

Therapeutische Antikörper können unterschiedlichste Antigene auf diversen Tumorentitäten ansteuern.⁴² Es eignen sich besonders Zielstrukturen, die konsistent und in einer angemessenen Dichte auf der Tumorzelle exprimiert vorliegen. Im Gegensatz dazu sollte die Expression auf gesunden Körperzellen limitiert sein. Um ein frühes Abfangen der Antikörper zu verhindern, sollte zudem möglichst wenig an freiem/löslichem Tumorantigen existieren.⁷⁷ Je nach Wirkmechanismus ist eine schnelle Internalisierung der Antigene im Komplex mit dem therapeutischen Antikörper von Vorteil (z. B. bei der Verwendung von Antikörper-Toxin-Konjugaten) oder von Nachteil, sofern Fc-vermittelte Effekte angestrebt werden.⁴² Prominente Zielstrukturen auf soliden Tumoren sind Wachstumsfaktorrezeptoren wie der EGF-Rezeptor oder HER2.^{83,84} Im hämatoonkologischen Bereich werden oftmals *cluster of differentiation* (CD) Oberflächenproteine wie CD19, CD20, CD38 oder CD52 angesteuert.^{85–88} Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen den EGF-Rezeptor oder CD38 gerichtet sind.

1.2.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor, auch ErbB1 genannt, wird auf gesunden, nicht-malignen Körperzellen insbesondere in der Haut, dem Atmungssystem und im Gastrointestinaltrakt exprimiert⁸⁹ und ist in vielen epithelialen Tumoren wie Brust-, Lungen-, Kolon-, Plattenepithel- oder Kopf-Hals-Karzinomen stark überexprimiert.^{90,91} Eine Hyperaktivierung des Rezeptors, hervorgerufen durch eine Überexpression, Liganden-unabhängige Aktivierung bei mutierten Rezeptoren, autokrine Aktivierung bei Ligandenüberschuss oder eine Liganden-unabhängige Aktivierung durch andere Rezeptorsysteme wie dem Urokinase-Plasminogen-Rezeptor, kann das onkologische Potential steigern.⁹²

Strukturell besteht der EGF-Rezeptor (Typ I-Transmembranprotein) aus einem extrazellulären Teil (unterteilt in vier Domänen) zur Ligandenbindung, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne für die intrazelluläre Signaltransduktion (Abbildung 5 in Kapitel 1.2.2). Nach Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors kann eine Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie wie ErbB2 oder ErbB3 erfolgen und dadurch eine Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne hervorrufen.

Es resultiert die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine verschiedener Signalwege: dem Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweg, dem Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalweg oder dem Jak/Stat bzw. Proteinkinase C-Signalweg mit einer anschließenden Modulation diverser Genexpressionen.⁹³

Ansätze für EGFR-gerichtete Therapieformen in der Tumorthherapie sind beispielsweise die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinasedomäne oder die Verwendung monoklonaler EGFR-gerichteter Antikörper.⁹⁴ Die wichtigsten Vertreter der therapeutischen Antikörper stellen hierbei Cetuximab und Panitumumab dar. Untersuchungen zeigten, dass sich die Epitope beider Antikörper überlappen und in der EGFR-Domäne III liegen, wobei beide Antikörper in der Lage sind eine Interaktion der Liganden mit dem Rezeptor zu verhindern.^{95–98}

Neben der Blockade einer Interaktion mit den natürlichen Liganden und folglich die Unterbindung der Signaltransduktion⁹⁹, als auch der Induktion einer Internalisierung des Rezeptors^{91,100}, können die Antikörper indirekte Effekte über den Fc-Teil (z. B. ADCC) vermitteln.¹⁰¹

1.2.2 Das Ektoenzym CD38

Das Oberflächenprotein CD38 kommt auf Lymphozyten wie T-, B- bzw. NK-Zellen und myeloische Zellen wie Neutrophilen oder Monozyten (jedoch nicht auf Makrophagen), aber auch in nicht-hämatologischen Zellen vor.¹⁰² Eine Überexpression von CD38 ist oftmals mit einer Vielzahl von Erkrankungen, z. B. Tumorerkrankungen, assoziiert.

Zu diesen zählen Leukämien wie die chronisch lymphatische Leukämie¹⁰³, akute lymphatische Leukämie¹⁰⁴, NK-Zell-Leukämie¹⁰⁵, akute myeloische Leukämie¹⁰⁶ und Lymphome wie das Mantelzell-Lymphom¹⁰⁷ und NK- bzw. T-Zell Lymphom¹⁰⁸, als auch das Multiple Myelom.¹⁰⁹ Neben den Tumorerkrankungen kann eine CD38-Überexpression ebenfalls bei einer HIV-Infektion^{110,111}, Autoimmunerkrankungen¹¹² und Osteoporose vorliegen.¹¹³

Anders als der EGF-Rezeptor ist CD38 ein Typ II-Transmembranprotein mit einer langen C-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 5).¹¹⁴ Kristallographische Analysen der

Ektodomäne erzielten hohe Sequenzübereinstimmungen mit der ADP-Ribosylzyklase aus *Aplysia californica*¹¹⁵, so dass dies Aufschluss auf eine der Funktionen von CD38 gab.

Neben der Zyklaseaktivität (Katalyse der Reaktion von NAD⁺ zur zyklischen ADP-Ribose, cADPR)¹¹⁶ fungiert CD38 ebenfalls als Hydrolase und begünstigt die Ausbildung von ADP-Ribose (ADPR) ausgehend von cADPR oder NAD⁺.^{116–118} ADPR, cADPR und NAD⁺ sind sekundäre Botenstoffe zur Ca²⁺-Freisetzung¹¹⁹, die wiederum in der Aktivierung diverser Signalwege biologischer Prozesse mündet wie beispielsweise der Lymphozytenproliferation.¹²⁰ Des Weiteren ist CD38 ein Rezeptor für CD31¹²¹, ein Oberflächenprotein, das z. B. auf Endothelzellen exprimiert wird.¹²² Durch die Interaktion von CD38 und CD31 kommt es zur Adhäsion zirkulierender Lymphozyten an Endothelzellen mit anschließender transendothelialer Migration der Immunzellen.¹²³ Zusätzlich induziert die Interaktion von CD38 und CD31 die Aktivierung humaner Leukozyten.^{121,124}

Eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern stellt eine sehr wirksame Methode zur CD38-gerichteten Therapie dar. Mit Daratumumab und Isatuximab sind bereits zwei therapeutische Antikörper zur Behandlung des Multiplen Myeloms in der Klinik.^{125,126} Dabei bindet Daratumumab an 27 Aminosäuren im extrazellulären Bereich zweier β -Stränge zwischen den Aminosäuren 189-202 und 223-236, wobei das Serin an der Position 230 eine essentielle Rolle bei der Bindung spielt.⁴⁸ Obwohl Isatuximab mit einem ähnlich großen Bereich (23 Aminosäuren) interagiert, überlappen die Daratumumab- und Isatuximab-Epitope nicht.^{127,128} Die Wirkmechanismen von Daratumumab sind vielfältig: Neben F_{ab}-vermittelten Effekten, wie der Modulation der Enzymaktivität oder der Apoptoseinduktion über Kreuzvernetzung, sind vor allem die Initiierung der CDC, ADCC und ADCP wichtige Mechanismen zur Eliminierung von Tumorzellen.⁴⁸

Weitere Ansätze für eine CD38-gerichtete Therapie bieten unter anderem kovalente bzw. nicht-kovalente CD38-Inhibitoren, die die enzymatische Aktivität herunterregulieren.^{129–131} Der Einsatz von chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) steht zunehmend im Fokus neuerer zellulärer Therapieformen für die akute lymphatische Leukämie der B-Zellen (B-ALL), der akuten myeloischen Leukämie (AML) und des Multiplen Myeloms.^{132–134}

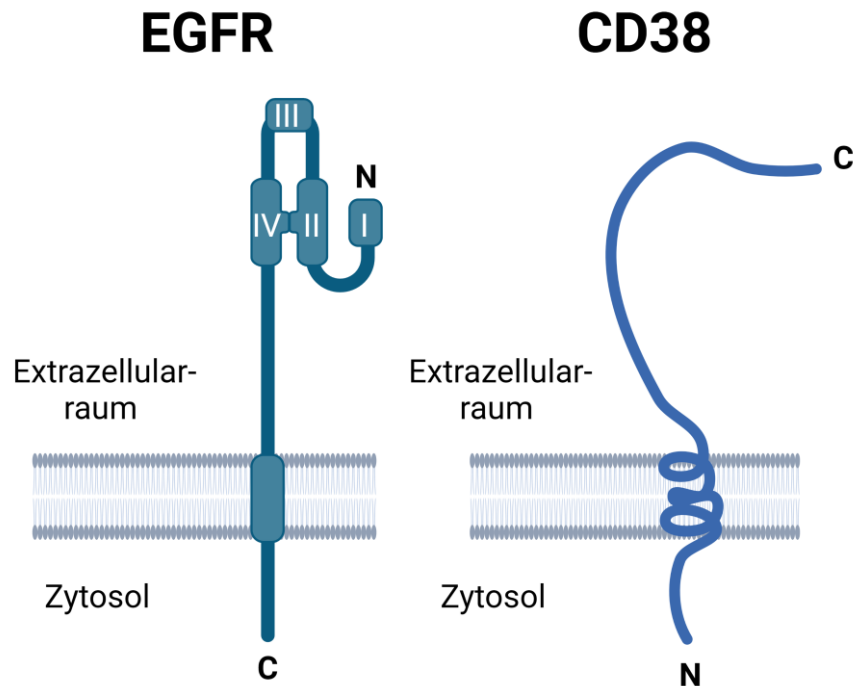


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Typ I-Transmembranproteins EGFR (Monomer) mit den extrazellulären Domänen I – IV (links) und des Typ II-Transmembranproteins CD38 (rechts).

1.3 Effektorzellen für Antikörper

Das Immunsystem bringt eine Vielzahl von Immunzellen hervor. Ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle kommt es zur Differenzierung von lymphoiden Zellen (NK-Zellen, B-Zellen/Plasmazellen, T-Zellen) oder myeloischen Zellen. Zu letzteren gehören Granulozyten (Eosinophile, Basophile, Neutrophile), Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, Megakaryozyten und Erythrozyten.² Relevante Immunzellpopulationen für die antikörperbasierte Tumormimmuntherapie sind dabei NK-Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen und polymorphkernige Granulozyten, da diese aktivierende Fc-Rezeptoren exprimieren.⁵⁶

1.3.1 Natürliche Killerzellen

Die zu den Lymphozyten zählenden Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und vor allem für die Zerstörung aberranter Zellen zuständig. Der Aktivierungsstatus einer NK-Zelle wird dabei maßgeblich durch die Expression diverser inhibitorischer Rezeptoren wie KIR (engl. *killer cell immunoglobulin-like*

receptor) oder NKG2A sowie aktivierender Rezeptoren wie NKp30 oder NKp46 gesteuert. Zusätzlich exprimieren NK-Zellen den aktivierenden Fc-Rezeptor FcγRIII, der eine Rekrutierung über IgG-Antikörper ermöglicht und somit in der antikörperbasierten Tumorimmuntherapie von Bedeutung ist.¹³⁵

Nach Aktivierung der NK-Zelle erfolgt die Zerstörung der körperfremden bzw. anormalen Zelle über die Freisetzung zytotoxischer Granula. Diese enthalten Perforine und Granzyme, welche eine Perforierung der Zellmembran herbeiführen (Perforine) und Apoptose induzieren (Granzyme). Neben der direkten Abtötung der Zielzelle sind NK-Zellen ebenfalls in der Lage durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder Zytokinen, unter anderem GM-CSF, die Aktivierung anderer Immunzellen wie myeloische Zellen zu beeinflussen.¹³⁵

1.3.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind mononukleäre Phagozyten, die wichtige Aufgaben in der Gewebemöostase und der Immunität übernehmen.¹³⁶

Die Monozyten kommen überwiegend in zwei Subpopulationen im Blut vor: den klassischen CD14-positiven Monozyten und den CD14/CD16-positiven Monozyten, die sich noch in weitere Untergruppen einteilen lassen.¹³⁷ Unter inflammatorischen Bedingungen sind Monozyten in der Lage ins Gewebe zu migrieren und sich dort zu Makrophagen zu differenzieren.¹³⁸ Die wichtigsten Aufgaben von Makrophagen sind die Phagozytose, die Antigenpräsentation über MHC Klasse-II- bzw. -Ia-Moleküle und die Produktion sekretorischer Moleküle wie Komplementproteine, Sauerstoffmetabolite, lysosomale Enzyme und regulatorische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.¹³⁶ Insbesondere Makrophagen spielen aufgrund der Expression aktivierender Fc-Rezeptoren (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa) eine wichtige Rolle in der antikörperbasierten Tumorimmuntherapie. Zusätzlich können sie über die Interaktion von IgA-Antikörpern mit dem FcαRI aktiviert werden.⁵⁶

Formal lassen sich Makrophagen in den M0-, M1- oder M2-Typus einteilen, wobei M0-Makrophagen nur *in vitro* vorliegen. Die klassisch aktivierten M1-Makrophagen fungieren in der Abwehr von Pathogenen (antimikrobiell bzw. antitumoral) und können proinflammatorische Zytokine, Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikale bilden und ausschütten.¹³⁹

Im Gegensatz zu M1-Makrophagen kommen die alternativ aktivierten M2-Makrophagen weniger in der Pathogenbekämpfung zum Einsatz. Stattdessen sind sie essentiell am Gewebeaufbau beteiligt.¹⁴⁰ Eine Polarisation zum M2-Typus kann dabei durch Stimulation mit Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-13 oder IL-33 erfolgen.¹⁴¹ Sezerniert werden die Interleukine von Mastzellen, Granulozyten oder T_H2-Zellen¹⁴¹, aber auch von Tumorzellen, so dass sich im Tumormilieu vorzugsweise M2-Makrophagen ausbilden und ansiedeln.¹⁴² Diese auch als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichneten Phagozyten spielen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression, da sie mitunter die extrazelluläre Matrix über Matrixmetalloproteasen abbauen und VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) zur Angiogenese sezernieren.¹⁴³ Zudem kann es durch Ausschüttung von beispielsweise IL-10 oder TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*) zur Immunsuppression kommen.¹⁴⁴ Zur Bekämpfung von Tumoren ist die antitumorale Reprogrammierung der TAM ein wichtiger Baustein. Diese kann beispielsweise pharmakologisch¹⁴⁵ oder über die Blockade mit monoklonalen Antikörpern von myeloischen Immuncheckpoints, auf die im Abschnitt 1.4 genauer eingegangen wird, erfolgen.^{146–148}

1.3.3 Polymorphkernige Granulozyten

Polymorphkernige Granulozyten gehören ebenfalls wie Monozyten und Makrophagen den myeloischen Zellen an. Die Namensgebung ist zurückzuführen auf das Vorliegen einer segmentierten Nukleusmorphologie und das Vorhandensein zahlreicher intrazellulärer Granula.¹⁴⁹ Unterteilt in Basophile, Eosinophile und Neutrophile übernehmen die Granulozyten wichtige Aufgaben in der Pathogenabwehr über die Phagozytose, der Degranulation, die sogenannte NETose, Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und der Trogozytose/Trogoptose. Über den Mechanismus der Trogoptose wird die Eliminierung von Tumorzellen ermöglicht. Durch einen aktiven Membranaustausch zwischen Neutrophilen und der Tumorzelle verliert die Tumorzellmembran ihre Integrität und die Tumorzelle stirbt.^{61,150–152} Allgemein kann eine Aktivierung dabei durch die Interaktion von IgG- oder IgA-Antikörpern mit aktivierenden Fc-Rezeptoren (Fc γ RI, Fc γ RIIa oder Fc α RI) erfolgen, wodurch Neutrophile wichtige Immunzellen für die antikörperbasierte Tumorimmuntherapie darstellen.⁵⁶

Den größten Anteil der Leukozyten im peripheren Blutsystem machen die Neutrophilen mit 50 % bis 70 % aus. Aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne im Gefäßsystem liegt eine hohe Produktionsrate von 10^{11} bis 10^{12} Zellen pro Tag vor.¹⁵³ Neutrophile können nach Stimulation durch Zytokine wie z.B. G-CSF (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) bis zu fünf Tage im peripheren Blut patrouillieren und körperfremde Erreger eliminieren.^{154,155} Zusätzlich sind Neutrophile in der Lage geweberesidente Pathogene zu bekämpfen. Hierfür durchqueren sie das Endothel (transepithial oder paraepithelial) und wandern entlang eines inflammatorischen Zytokingradienten in Richtung Entzündungsherd.¹⁵³ Zudem können Neutrophile über Interaktionen mit *Pattern Recognition*-Rezeptoren¹⁵⁰ oder durch Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren nach Opsonisierung von Pathogenen bzw. Tumorzellen spezifisch aktiviert werden.^{50,156,157}

Ähnlich wie bei den Makrophagen existieren ebenfalls tumorassoziierte Neutrophile (TAN), die an der Tumorprogression/Immunsuppression beteiligt und oftmals mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert sind.¹⁵⁸ Auch bei den Neutrophilen lässt sich eine Einteilung in einen protumoralen (N2) und einen antitumoralen (N1) Phänotyp vornehmen¹⁵⁹, wobei hier die Präsenz des TGF- β im Tumormilieu eine wichtige Rolle für die N2-Polarisierung spielt.¹⁶⁰ Durch beispielsweise ein verstärktes Vorkommen von Interferonen wie INF- β zeigt sich jedoch eine Repolarisierung der TAN in Richtung antitumorale Neutrophile, so dass auch hier eine Bekämpfung des Tumors wieder begünstigt wird.¹⁶¹

1.4 Myeloische Immuncheckpoints in der Tumorimmuntherapie

Eine wichtige Rolle zur Differenzierung von körpereigenen und körperfremden Zellen spielen Immuncheckpoints. Unter physiologischen Bedingungen dienen Immuncheckpoints der Prävention von Autoimmunität. Dabei interagieren Immunzellen beispielsweise über die Expression bestimmter inhibitorischer Rezeptoren mit Liganden körpereigener Zellen und werden dadurch inhibiert. Diesen Mechanismus machen sich jedoch auch Tumorzellen zu Nutze um einer Immunantwort zu entkommen.¹⁶²

Je nach Immunzellpopulation können diverse Immuncheckpoint-Moleküle vorliegen. So befinden sich auf T-Zellen unter anderem die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*)^{163,164} und PD1 (engl. *programmed cell death 1*)¹⁶⁵, auf NK-

Zellen KIR (engl. *killer immunoglobulin-like receptors*) und NKG2A^{166,167} und auf myeloischen Zellen vor allem SIRP α (engl. *signal regulatory protein alpha*)^{168,169}, LILRB1 (engl. *leukocyte immunoglobulin-like receptor B1*)¹⁷⁰ und Siglec-10 (engl. *sialic acid binding Ig like lectin 10*).^{171,172}

Eine Inhibition dieser Immuncheckpoint-Interaktionen ist ein essentieller Bestandteil in der Tumorzellbekämpfung.¹⁷³ Derzeit kommen zahlreiche monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Immuncheckpoint-Moleküle zum Einsatz. Die prominentesten Vertreter sind Ipilimumab (anti-CTLA-4), Nivolumab (anti-PD-1), Pembrolizumab (anti-PD-1) und Atezolizumab (anti-PD-L1).^{174–176} Insbesondere die T-Zell-Immunmodulatoren sind als Einzel- oder Kombinationstherapie für die Behandlung von rund 50 Tumorentitäten in der Klinik zugelassen, wobei mehr als 3000 aktive Studien (2/3 aller onkologischen Studien) auf die Immuncheckpoint-Inhibition von T-Zellen abzielen.^{177,178} Neben des Einsatzes monoklonaler Antikörper konnten auch niedermolekulare Verbindungen eine Immuncheckpoint-Inhibition durch beispielsweise die Internalisierung von PD-L1 auf Tumorzellen begünstigen.¹⁷⁹ In Bezug auf eine verbesserte Aktivierung myeloischer Zellen eignet sich die Inhibition der CD47-SIRP α -Interaktion.^{180,181} Tumorzellen überexprimieren oftmals CD47¹⁶⁹, so dass eine Interaktionsblockade zwischen CD47 und SIRP α die Aktivierung myeloischer Zellen begünstigen kann. In Kapitel 1.4.2 werden mögliche Strategien zur Blockade des myeloischen Checkpoints genauer beleuchtet.

Die Relevanz der Immuncheckpoints spiegelt sich zudem im Nobelpreis 2018 in Physiologie und Medizin wider, bei dem James Allison und Tasuku Honjo für die Entdeckung negativer Immunregulationen ausgezeichnet wurden.¹⁸²

1.4.1 Die CD47-SIRP α -Interaktion

Die Interaktion zwischen CD47, auch IAP (engl. *integrin-associated protein*) genannt, und dem auf myeloischen Zellen exprimierten SIRP α ist ein relevanter Mechanismus zur Identifikation von körpereigenen Zellen und spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase hämatologischer Zellen, vor allem von Erythrozyten und Thrombozyten.^{183,184}

CD47 ist ein Typ I-Transmembranprotein der Ig-Superfamilie mit einer Ig-ähnlichen extrazellulären Domäne, fünf Transmembrandomänen sowie einer kurzen zytoplasmatischen

Domäne¹⁸⁵ und ist ein Ligand für SIRP α .¹⁸⁶ Kristallographische Analysen zeigten, dass am extrazellulären N-Terminus des CD47 ein Pyroglutamat (pGlu) vorliegt und sich in der Interaktionsfläche zu SIRP α befindet (Abbildung 7).¹⁸⁷ Neben SIRP α und Integrinen wurde Thrombospondin-1 als weiterer Interaktionspartner von CD47 identifiziert.¹⁸⁸

CD47 wird ubiquitär auf allen Zellen exprimiert und fungiert als Identitätsmarker. Durch die Bindung von CD47 an SIRP α wird die CD47-exprimierende Zelle als körpereigen erkannt und nicht angegriffen. Diverse maligne Zellen z. B. der akuten myeloischen Leukämie (AML), non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), Mammakarzinomen oder Melanomen machen sich diesen Mechanismus zu Nutze und überexprimieren CD47, wobei eine CD47-Überexpression mit einer schlechten klinischen Prognose korreliert.¹⁶⁹

Die CD47-Expression bzw. das Vorliegen von vollständig posttranslational modifiziertem CD47 wird dabei durch unterschiedliche Faktoren wie Zytokine, Onkogene, mikroRNAs oder Enzyme beeinflusst. Beispielsweise wurden TNF- α , IL-6 und IL-1 β als Verstärker der CD47-Expression in Tumoren identifiziert.^{189–191} Die Transkriptionsfaktoren HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) oder MYC können den CD47-Promoter binden und somit die CD47-Transkription induzieren.^{192,193} Im Gegensatz dazu sind nicht-kodierende mikroRNAs in der Lage die Expression zu reduzieren. Sie führen nach Bindung der spezifischen mRNA zu einer Degradierung dieser und/oder blockieren die Translation.¹⁹⁴ Studien zeigten zudem, dass das Golgi-residente Isoenzym der Glutaminylzyklase (Isoglutaminylzyklase, engl. *glutaminyl-peptide cyclotransferase like*, kurz QPCTL) CD47-Moleküle posttranslational modifiziert.^{195,196}

Glutaminylzyklasen zählen zu den Transferasen (EC 2.3.2.5) und katalysieren den Ringschluss (Lactam) von N-terminalen Glutamin- (wie bei CD47) oder Glutamatresten: Unter Abspaltung einer Aminogruppe (Glutamin) oder Wasser (Glutamat) entstehen die charakteristischen Pyroglutamatreste (Abbildung 6)^{197,198}, durch die eine exakte Bindung von regulatorischen Peptiden an ihre Rezeptoren und/oder der Schutz vor einem Abbau durch Exopeptidasen gewährleistet wird.¹⁹⁹ Somit ist die Isoglutaminylzyklase für die Ausbildung des an der Interaktion zu SIRP α beteiligten Pyroglutamats am CD47 N-Terminus verantwortlich. Neben CD47 sind eine Vielzahl weiterer Substrate der QPCTL wie Chemokine und Hormone bekannt.^{200,201}

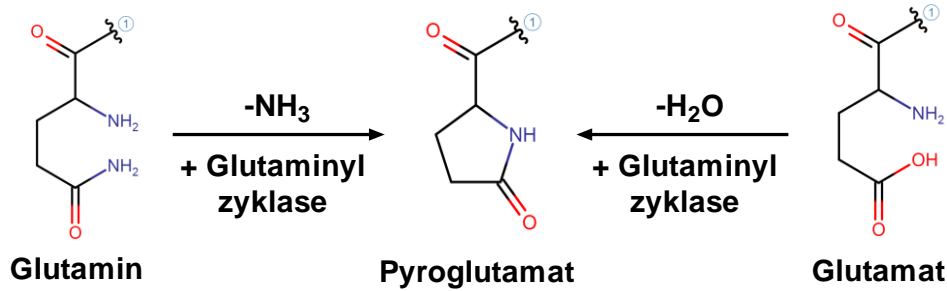


Abbildung 6: Reaktion von Glutamin- oder Glutamatresten zu Pyroglutamat katalysiert durch Glutaminylzyklasen.
 ① = Peptidrest

Das Typ I-Transmembranprotein SIRP α , auch SHPS-1, BIT oder CD172a genannt²⁰², setzt sich aus drei Ig-ähnlichen extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit inkludierten Phosphorylierungsstellen (Tyrosinresten) zusammen.^{203,204} Neben der Bindung von CD47 sind Mitogene wie die Wachstumsfaktoren EGF und PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) in der Lage die Tyrosinphosphorylierung von SIRP α zu induzieren.²⁰³

Nach Bindung der extrazellulären CD47-Domäne an den N-terminalen Bereich von SIRP α (Abbildung 7) kommt es zur Induktion eines inhibitorischen ITIM-Signals in der myeloischen Zelle, das in diesem Falle auch als „don't eat me“-Signal beschrieben wird. Während der Signaltransduktion werden zunächst zwei Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne des SIRP α über Src-Tyrosinkinasen phosphoryliert. Anschließend erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosinphosphatasen SHP-1 oder SHP-2, wobei SHP-1 bzw. SHP-2 im Anschluss ihre Substrate (z. B. PIP3) dephosphorylieren und somit eine inhibitorische Regulation von *Downstream*-Effekten wie der Phagozytose herbeiführen.^{184,205}

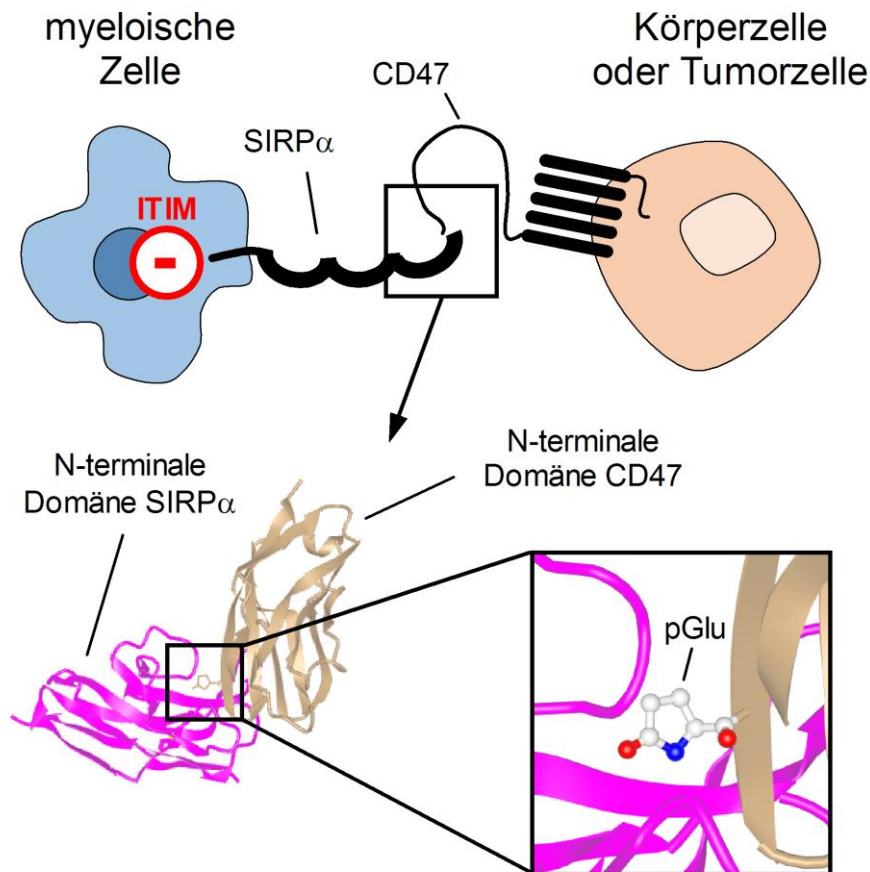


Abbildung 7: Die Interaktion zwischen CD47 und SIRP α .

Myeloische Zellen exprimieren den inhibitorischen Rezeptor SIRP α , der mit dem auf Körperzellen oder oftmals auf Tumorzellen überexprimierten Liganden CD47 interagiert. Durch die Bindung wird ein ITIM-Signal/„don't eat me“-Signal induziert, das die myeloische Zelle von einer Bekämpfung der interagierenden Zelle abhält. Aus kristallografischen Analysen ging hervor, dass ein Pyroglutamatrest (pGlu) am N-Terminus des CD47 maßgeblich an der Interaktion beteiligt ist (Kristallstruktur: 2JJT¹⁸⁷).

1.4.2 Inhibition der CD47-SIRP α -Interaktion als therapeutischer Ansatz

Durch die diversen Faktoren, die die CD47-Expression beeinflussen, ergeben sich viele Möglichkeiten für eine indirekte Inhibition der CD47-SIRP α -Interaktion. So ließ sich durch den Einsatz des TNF- α gerichteten Antikörpers Infliximab die CD47-Expression auf der Mamma-karzinomzelllinie MCF7 reduzieren.¹⁸⁹ JQ1, ein Bromodomänen-Extra-Terminaler (BET)-Inhibitor, soll MYC in Tumorzellen inhibieren und dadurch die CD47-Expression herunterregulieren.^{193,206} Die mikroRNA miR-708 fungiert als Tumorsuppressor^{207,208}, der die Expression von CD47 beispielsweise bei der akuten lymphatischen Leukämie von T-Zellen (T-ALL) inhibiert und die Phagozytose der Tumorzellen verstärkt.²⁰⁹ Neben miR-708 erzielten miR-155 und miR200a eine Herunterregulation der CD47-Expression auf Myelomzellen in Mäusen als auch auf Nasopharynxkarzinomzellen und konnten somit die Phagozytose verstärken.^{210,211}

Studien zeigten zudem, dass die Verwendung spezifischer QPCTL-Inhibitoren wie SEN177 (chemische Struktur vgl. Abbildung 8 A) ^{212–214} die Aktivität der Isoglutaminyklyase beeinflussen. Kristallographische Analysen ließen dabei erkennen, dass SEN177 das im aktiven Zentrum vorliegende Zink(II)-Ion der Glutaminyklyase über das N1-Stickstoffatom des Triazolrestes komplexiert²¹⁴ (Abbildung 8 B), und dadurch die katalytische Fähigkeit reduziert wird. Folglich konnte durch die Verwendung von SEN177 die Interaktion zu SIRP α vermindert¹⁹⁵ und die Tumorzelleliminierung von beispielsweise epidermalen Karzinomzellen (A431), Lymphomzellen (Raji) oder Kolonkarzinomzellen (DLD1 und HCT116) in Kombination mit therapeutischen Antikörpern verstärkt werden.^{195,196}

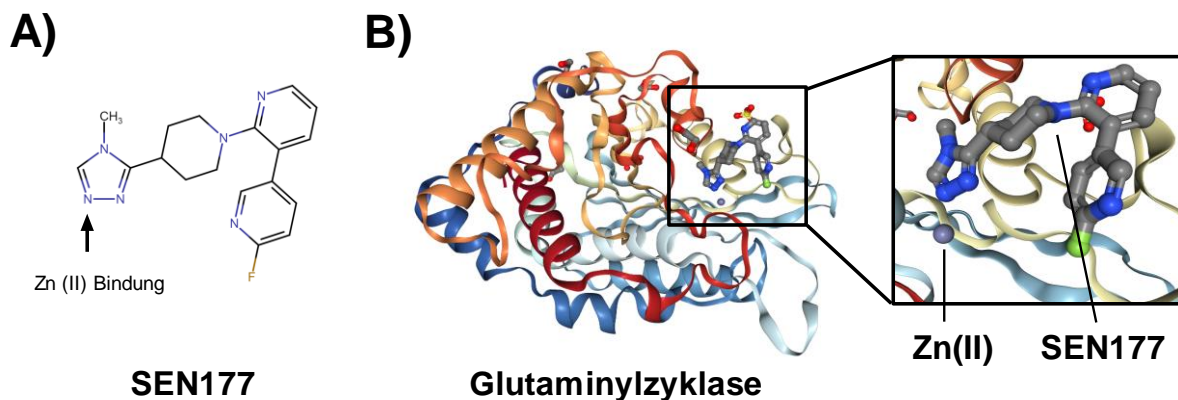


Abbildung 8: SEN177 im Komplex mit einer Glutaminyklyase.
 A) chemische Struktur von SEN177 B) SEN177 lagert sich mit seinem N1 des Triazolrestes an das im aktiven Zentrum der Glutaminyklyase vorliegende Zn(II) an (Struktur: 6GBX²¹⁴).

Neben den indirekten Mechanismen zur CD47-SIRP α -Interaktionsblockade lässt sich diese auch auf direktem Wege inhibieren.²¹⁵ Die wohl am weitesten in der klinischen Entwicklung befindlichen Moleküle sind CD47- oder SIRP α -gerichtete Antikörper und Fusionsproteine bestehend aus der SIRP α -Ektodomäne und einem Fc-Teil.

Mit Magrolimab (Hu5F9-IgG4)²¹⁶ ist ein CD47-gerichteter Antikörper in klinischen Studien, der in Kombination mit Rituximab vielversprechende Resultate bei der Therapie von Patienten mit non-Hodgkin-Lymphomen erzielte.^{217,218} Zudem ging aus Daten einer klinischen Phase 1-Studie hervor, dass bei AML-Patienten, die sich nicht für eine intensive Chemotherapie eignen, nach der kombinatorischen Behandlung mit Magrolimab plus Azazitidin ein beständiges Ansprechverhalten und verlängertes Gesamtüberleben resultierte.²¹⁹

Neben den positiven Effekten induzierte Magrolimab jedoch auch Toxizitäten (z. B. Anämie und Thrombozytopenie). Aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen besteht ein Interesse an einer Optimierung des CD47-Blockadeantikörpers bzw. ein Interesse an alternativen Strategien zur CD47-SIRP α -Interaktionsblockade wie einer Inhibition der QPCTL, bei denen die Nebenwirkungen reduziert werden könnten.

Zu den SIRP α -Fusionsproteinen (mit IgG1-Fc-Teil) zählt TTI-621, das *in vivo* das Wachstum aggressiver AML und B-Zell-Lymphomen in xenogenen Tiermodellen reduzierte²²⁰ und sich derzeit in der klinischen Phase 1 befindet.²²¹ Ein monoklonaler Antikörper, der gegen SIRP α gerichtet ist (BI 765063), erzielte in klinischen Studien Phase 1 bei soliden Tumorerkrankungen in fortgeschrittenen Stadien ein gutes Ansprechverhalten und zeigte ein gutes Sicherheitsprofil auf.²²²

Des Weiteren wird an der Verwendung von niedermolekularen Verbindungen oder Peptiden geforscht, die sich beispielsweise in die Bindungstasche der interagierenden Proteine anlagern. Pep-20, ein neuartiger CD47 Inhibitor, führte zur gesteigerten Phagozytose von soliden und hämatologischen Tumorzellen.²²³ Auf der anderen Seite lässt sich SIRP α spezifisch durch beispielsweise das makrozyklische Peptid D4-2 blockieren. *In vivo*-Versuche zeigten dabei, dass die Kombination aus Rituximab und D4-2 das Tumorwachstum von Raji-Zellen effizient supprimierte.²²⁴

1.5 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung der Arbeit

Immuncheckpoint-Inhibitoren revolutionieren die Tumorthherapie. Bis dato werden überwiegend T-Zellen über monoklonale Antikörper wie Ipilimumab für eine Blockade im Patienten angesteuert. Die spezifische Aktivierung myeloischer Zellen als Immunzellpopulation könnte ebenfalls vielversprechende Erfolge erzielen. Nicht nur weil Neutrophile die größte Immunzellpopulation im peripheren Blut darstellen, sondern weil myeloische Zellen hauptsächlich an der Tumorprogression als tumorassoziierte Makrophagen bzw. tumorassoziierte Neutrophile beteiligt sind und somit eine Reaktivierung der Zellen wichtig für die Tumorbekämpfung sein kann.

Aus eigenen Vorarbeiten im Rahmen der Masterarbeit ging bereits hervor, dass eine Glutaminylzyklaseinhibition das immuntherapeutische Potential monoklonaler Antikörper gegen solide als auch hämatologische Tumorzellen unter Verwendung von Neutrophilen und Makrophagen verstärken konnte. Die Daten dienten als Grundlage der Dissertation und wurden in dieser Arbeit weiter vertieft.

Im Rahmen der Dissertation sollte der Einfluss einer indirekten als auch einer direkten CD47-SIRP α -Interaktionsblockade in Kombination mit einer klassischen antikörperbasierten Immuntherapie untersucht werden. Dabei lag der Fokus insbesondere auf der Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen. Als indirekte CD47-SIRP α -Interaktionsblockade sollte die Inhibition der Isoglutaminylzyklase mit Hilfe der niedermolekularen Verbindung SEN177 in EGFR-positiven Karzinomzellen und als direkte Interaktionsblockade ein selbstproduzierter CD47-Blockadeantikörper gegen CD38-positiv Leukämiezellen analysiert werden. Zudem sollte der Vergleich der verwendeten Isotypen (IgG vs. IgA) von therapeutischen Antikörpern weiteren Aufschluss auf das Potential der Antikörper für eine effektive Aktivierung der myeloischen Zellen geben.

2. Material & Methoden

2.1 Ethikvotum und Einverständniserklärung der Spender

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Blut von gesunden Spendern als auch ALL-Patienten wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki begutachtet. Die ALL-Patienten wurden im Rahmen der ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studienprotokolle ALL-BFM 2000/2009 behandelt. Alle Spender gaben das schriftliche Einverständnis zur Verwendung des Blutes zu Forschungszwecken und wurden aus einer zufälligen Kohorte ausgewählt.

2.2 Verwendete Materialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
<i>Biosphere</i> ® filter tips (20/300/1250 µl)	Sarstedt, DE
Citrat- und Serum-Röhrchen	Sarstedt, DE
Dialyseschläuche Spectra/Por	Spectrum Labs, CA, USA
Elektroporationsküvette <i>Gene Pulser</i> <i>Electroporation Cuvettes</i>	Bio-Rad, CA, USA
Elektroporationsküvette OC-400	MaxCyte, MD, USA
ELISA-Platten <i>MaxiSorb</i>	Nunc, NY, USA
Falcon konische Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Sarstedt, DE
Nitrilhandschuhe (nitra tex)	Ansell Healthcare, B
Pipettenspitzen (10/200/1250 µl)	Sarstedt, DE
Reaktionsgefäße <i>Safe seal micro tube</i> (1,5/2 ml)	Sarstedt, DE
Rundbodenröhrchen (5 ml)	Sarstedt, DE
Serologische Pipetten (5 / 10 / 25 / 50 ml)	Sarstedt, DE

Fortsetzung Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflasche <i>EasYFlask</i>	Nunc, NY, USA
Zellkulturflaschen mit Filter	Greiner, DE
6-, 96-Well-Platte (Flach- und Rundboden)	Sarstedt, DE
96-Well-Platte (v-förmiger Boden)	Sarstedt, DE
<i>96-Well sample plate flexible</i>	Perkin Elmer, MA, USA

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Accutase	Gibco/Life Technologies, MT, USA (#00-4555-56)
Acrylamid <i>Rotiphorese Gel 30</i>	Carl Roth, DE (#3029.1)
Ampicillin	Carl Roth, DE (#K029.3)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, DE (#101201)
<i>All-trans</i> Retinsäure (ATRA)	Sigma-Aldrich, OH, USA (#R2625)
Bromphenolblau	Carl Roth, DE (#T116.2)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, DE (#T844.3)
<i>Capture Select FcXL Affinity Matrix</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#194328005)
Zelldissoziationspuffer	Gibco/Life Technologies, MT, USA (#13151014)
<i>Coomassie Brilliant Blue R 250</i>	Carl Roth, DE (#3862.2)
Destilliertes Wasser (dH ₂ O)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#15230001)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, DE (#102952)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, DE (#6908.1)
Elektroporationspuffer	MaxCyte, MD, USA (#EPB-5)
<i>Ficoll-Paque Plus</i>	Cytiva, MA, USA (#GE17-1440-02)
Glukose	Sigma-Aldrich, OH, USA (#G8270)
Glyzerin	Carl Roth, DE (#10657054)
Glyzin	Carl Roth, DE (#3790.1)

Fortsetzung Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) rekombinant, human	CellGenix, NH, USA (#1012-050)
Hefeextrakt	Carl Roth, DE (#2363.1)
Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), rekombinant, human	PeptoTech, DE (#300-25)
Methanol	Merck, DE (#106009)
Magermilchpulver <i>Blotting-Grate Blocker</i>	Bio-Rad, CA, USA (#1706404)
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Merck, DE (#110732)
Natriumazidpulver	Merck, DE (#8223350100)
Natriumchlorid	Carl Roth, DE (#3957.1)
Natriumlaurylsulfat, SDS	Merck, DE (#817034)
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, OH, USA (#B5887)
NP40-Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#J60766.AP)
Phosphat-gepufferte Saline, PBS, 1x und 10x	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, CA, USA (#14040117 bzw. #14080055)
pHRodo	Invitrogen, CA, USA (#10092953)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, OH, USA (#10837091001)
Polymorphprep	ProteoGenix, FR (#1114683)
<i>Precision Plus Protein™ Standard Dual Color</i>	Bio-Rad, USA (#1610374)
Proteasehemmer-Cocktail	Sigma-Aldrich, OH, USA (#P2714)
SEN177	Sigma-Aldrich, OH, USA (#SML1615)
SIRP α -Ektodomäne mit His-Tag rekombinant, human	Sino Biologicals, CN (#11612-H08H)
Chemilumineszenzsubstrat <i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#34075)
Szintillationslösung <i>OptiPhase Hisafe 3</i>	PerkinElmer, MA, USA (#1200.437)
Tetramethylbenzidin (TMB) Flüssigsubstrat	Sigma-Aldrich, OH, USA (#T0440)

Fortsetzung Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, DE (#108382)
TRITON-X-100	Merck, DE (108643)
Trypanblaulösung	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#15250061)
Trypsin-EDTA	Gibco/Life Technologies, MT, USA (#11560626)
TWEEN20	Merck, DE (#817072)
TC Yeastolate UF	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#292804)
⁵¹ Natriumchromat 185 Mbq/ml, 5 mCi/ml	Hartmann Analytic GmbH, DE (#ARX0101A)

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
ELISA-Blockadepuffer	1x PBS + 1 % BSA
ELISA-Waschpuffer	1x PBS + 0,05 % TWEEN20
Elutionspuffer	dH ₂ O + 0,1 M Glyzin, pH 3
FACS-Puffer	1x PBS + 1 % (w/v) BSA + 0,1 % (v/v) Natriumazid
Immunblot-Blockadelösung	1x TBS + 5 % Magermilchpulver
Ladepuffer (5x)	<u>reduzierend:</u> dH ₂ O + 313 mM Tris + 10 % (w/v) SDS + 0,05 % (w/v) Bromphenolblau + 50 % (v/v) Glycerin + 0,5 M DTT

Fortsetzung Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Ladepuffer (5x)	<u>nicht-reduzierend:</u> dH ₂ O + 313 mM Tris + 10 % (w/v) SDS + 0,05 % (w/v) Bromphenolblau + 50 % (v/v) Glyzerin
MaxCyte-Futterlösung	CHO CD <i>EfficientFeed</i> + 14% (v/v) <i>Yeastolate Stock Solution</i> + 3,5% (v/v) GlutaMax + 12,4% (v/v) Glukose
Neutralisationspuffer	dH ₂ O + 1 M TRIS, pH 8
Polyacrylamid-Sammelgel	dH ₂ O + 11 % Acrylamid + 48 % Sammelgelpuffer (s.u.) + 0,1 % (v/v) TEMED + 1 % (v/v) APS
Polyacrylamid-Trenngel	<u>10 %-ig:</u> dH ₂ O + 36% (v/v) Acrylamid + 28 % (v/v) Trenngelpuffer (s.u.) + 0,1 % (v/v) TEMED + 1 % (v/v) APS <u>12 %-ig:</u> dH ₂ O + 43 % (v/v) Acrylamid + 28 % (v/v) Trenngelpuffer (s.u.) + 0,1 % (v/v) TEMED + 1 % (v/v) APS
Sammelgelpuffer	dH ₂ O + 0,5 M Tris, pH 6,8
SDS-Laufpuffer (1x)	dH ₂ O + 125 mM Tris + 0,5% (v/v) SDS (20%w/v) + 1,25 M Glycin

Fortsetzung Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Trenngelpuffer	dH ₂ O + 1,5 M Tris, pH 8
TBS-Puffer (10x)	dH ₂ O + 50 mM Tris + 150 mM NaCl, pH 7,6
TBST-Puffer	TBS (1x) + 0,1 % (v/v) TWEEN20

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Kit zur durchflusszytometrischen Quantifizierung QIFIKIT	Dako, DK (K0078)
MTS-basierter Proliferationstest <i>CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell</i>	Promega, WI, USA (#G3582)
Neon™ Transfektionssystemkit	Invitrogen, CA, USA (#MPK10096)
NK-Zelle-Isolationskit <i>MACS NK cell isolation Kit</i>	Miltenyi Biotech, DE (#130-092-657)
Plasmidisolationskit <i>NucleoBond Xtra Maxi EF</i>	MACHEREY-NAGEL, DE (#740424.10)
Proteindeglykosylierungskit <i>Protein Deglycosylation Mix II</i>	New England Biolabs (NEB), MA, USA (P6044S)
Proteinkonzentrationsbestimmungskit <i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, FL, USA (#23225)
Zellmarkierungskit <i>CSFE Cell Division Tracker Kit</i>	BioLegend, CA, USA (#423801)

Tabelle 5: Primärantikörper

Antigen	Spezies/Ig-Typ/Klon	Hersteller/Vertreiber
β-Tubulin	Maus/IgG1/AA2	Abcam, UK (#ab231082)
CD16	Maus/IgG1/3G8	BioLegend, CA, USA (#302002)
CD20 (Rituximab, RTX)	Mensch-Maus-Chimär/ IgG1/C2B8	Hoffmann-La Roche, CH (Bezug über UKSH)
CD20 (Rituximab-IgG2, RTX-IgG2)	Mensch-Maus-Chimär/ IgG2/C2B8	Labor Prof. Dr. T. Valerius
CD20 (Rituximab-IgA2, RTX-IgA2)	Mensch-Maus-Chimär/ IgA2/C2B8	Labor Prof. Dr. T. Valerius
CD32a	Maus/IgG2b/IV.3	BioXCell, NH, USA (#BE0224)
CD32b/c	Maus/IgG1/S18005H	BioLegend, CA, USA (#398304)
CD38	Maus/IgG1/HB-7	BioLegend, CA, USA (#356602)
CD38 (Daratumumab, DARA)	Mensch/IgG1/005	Janssen Biotech, NJ, USA (Bezug über UKSH)
CD38 (Daratumumab-IgA2, DARA-IgA2)	Mensch/IgA2 (auf Basis des IgA2.0 ³⁷)/005	Labor Prof. Dr. T. Valerius
CD47	Maus/IgG1/B6H12	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#14-0479-82)
CD47	Maus/IgG1/CC2C6	BioLegend, CA, USA (#323102)
CD47 (Blockadeantikörper)	Mensch/IgG2σ (σ = ohne Fc Rezeptorbindung)/5F9	Labor Prof. Dr. M. Peipp, PD Dr. C. Kellner
CD64	Maus/IgG1/4A10-1	Antikörper-online, DE (#ABIN2145223)
CD89	Maus/IgG1/A59	BioLegend, CA, USA (#354102)
EGFR (Cetuximab, CTX)	Mensch-Maus- Chimär/IgG1/225	Merck, DE (Bezug über UKSH)
EGFR (Cetuximab-IgA2, CTX-IgA2)	Mensch-Maus- Chimär/IgA2 (auf Basis des IgA2.0 ³⁷)/225	Labor Prof. Dr. T. Valerius

Fortsetzung Tabelle 5: Primärantikörper

EGFR (Matuzumab, MTZ)	Humanisiert/IgG1/425	Merck, DE (Bezug über UKSH)
EGFR (Panitumumab, PANI)	Mensch/IgG2/E7.6.3	Amgen, CA, USA (Bezug über UKSH)
SIRP α	Maus/IgG1/15-414	BioLegend, CA, USA (#372102)
QPCTL (HRP-Konjugat)	Maus/IgG2a/B-3	SantaCruz Biotechnologies, TX, USA (#sc-515717 HRP)

Tabelle 6: Fusionsproteine

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller/Vertreiber
huCD47-wt-Fc	Humane CD47-Ektodomäne mit humanem IgG1 σ -Fc (ohne Fc-Rezeptorbindung ²²⁵)	Labor Prof. Dr. T. Valerius
huCD47-Q1A-Fc	Humane CD47-Ektodomäne mit Aminosäureaustausch Q1A und humanem IgG1 σ -Fc (ohne Fc-Rezeptorbindung ²²⁵)	Labor Prof. Dr. T. Valerius
SIRP α -Fc	modifizierte humane SIRP α -Ektodomäne ²²⁶ mit humanem IgG2 σ -Fc (ohne Fc-Rezeptorbindung ²²⁵)	Labor Prof. Dr. M. Peipp

Tabelle 7: Kontrollantikörper und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung*	Hersteller/Vertreiber
Murine IgG1 Isotypkontrolle (Klon: MOPC-21, Spezifität unbekannt)	s. Methoden/ Abbildungslegende	BioLegend, USA (#400101)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H&L)-HRP	1:5000	JacksonImmuno Research, PA, USA (#111-035-003)

Fortsetzung Tabelle 7: Kontrollantikörper und Sekundärantikörper

Ziege anti-human IgG-HRP	1:5000	ImmunoReagents, NC, USA (#GtxHu-003-DHRPX)
Ziege anti-human IgG (Fc γ spez.) F(ab') ₂ -FITC	1:50	JacksonImmuno Research, PA, USA (#109-095-003)
Ziege anti-human IgG (Fc γ spez.) F(ab') ₂ -PE	1:50	JacksonImmuno Research, PA, USA (#109-001-008)
Ziege anti-human IgA (Fc spez.) F(ab') ₂ -FITC	1:50	Invitrogen, CA, USA (#H14101)
Ziege anti-murin IgG (Fc γ spez.) F(ab') ₂ -FITC	1:50	JacksonImmuno Research, PA, USA (#109-096-008)
Ziege anti-human Kappa-Leichtkette F(ab') ₂ -FITC	1:20	Southern Biotech, AL, USA (#2060-02)

*ausgehend von der Stocklösung nach Herstellerangabe

Tabelle 8: Bakterienstämme und Plasmide

Bezeichnung	Stamm/Vektor	Hersteller/Vertreiber
<i>XL1-Blue Competent Cells</i>	<i>E.Coli</i>	Stratagene, CA, USA
huCD47-IgG1 σ	pcDNA3.1(+)	GeneArt Gene Synthesis/ Thermo Fisher Scientific, MA, USA
huCD47-Q1A-IgG1 σ	pcDNA3.1(+)	GeneArt Gene Synthesis/ Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Tabelle 9: Kulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
CD-CHO Medium/ CD-OptiCHO Medium	Life Technologies, CA, USA (#10743011 bzw. #10716013)
Nährstoffsupplement <i>CHO CD Efficient Feed A</i>	Life Technologies, CA, USA (#A1024001)

Fortsetzung Tabelle 9: Kulturmedien und Zusätze

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , DMEM	Gibco/Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#11500416)
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, CA, USA (#26140079)
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#13462629)
Ham's F12-Medium	Lonza, CH (#12-615F BE12-615F)
HT-Supplement	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#11067030)
Monozyten-Adhärenzmedium	PromoCell GmbH, DE (#C-28051)
Penicillin/Streptomycin, Pen/Strep	Invitrogen, CA, USA (#15140148)
Pluronic F-68	Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#24040032)
RPMI-Medium 1640	Gibco/Thermo Fisher Scientific, MA, USA (#11530586)
SOC-Medium	Invitrogen, CA, USA (#15544034)
Serum-freies hämatopoetisches Zellmedium X-VIVO™ 15	Lonza, CH (#BE02-053Q)
2x YT Medium/2x YT Agar	Carl Roth, DE (#X966.1 bzw. #X967.1)

Tabelle 10: Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Kultivierung
A431 (humane epidermoides Karzinom)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), DE	89 % RPMI 1640 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
Ba/F3 (murine pro B-Zelllinie)	Bereitstellung von AG Dr. Leo Koenderman (Universitätsklinikum Utrecht)	95 % RPMI 1640 + 5 % FKS hitzeinaktiviert + 10 ng/ml IL-3 (murin)

Fortsetzung Tabelle 10: Zelllinien

CHO-S (Ovarialzellen des Hamsters)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA	<u>vor Transfektion:</u> 99 % CD-CHO Medium (+ 1 % (v/v) HT Supplement + 2 mM GlutaMAX <u>nach Transfektion:</u> 98 % CD OptiCHO Medium + 1 % (v/v) HT Supplement + 2 mM GlutaMAX + 1 % (v/v) Pluronic F-68
DiFi (humanes Kolonkarzinom)	<i>American Type Culture Collection</i> (ATCC), VA, USA	89 % DMEM + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
HSB-2 (humane T-Zell akute lymphatische Leukämie)	DSMZ, DE	89 % RPMI 1640 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
Kyse-30 (humanes Ösophaguskarzinom)	DMSZ, DE	45 % RPMI 1640 + 44 % Ham's F12 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
MDA-MB-468 (humanes Mammakarzinom)	DSMZ, DE	89 % RPMI 1640 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
MOLT-13 (humane T-Zell akute lymphatische Leukämie)	DSMZ, DE	89 % RPMI 1640 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep
P12-ICHIKAWA (humane T-Zell akute lymphatische Leukämie)	DSMZ, DE	89 % RPMI 1640 + 10 % FKS (hitzeinaktiviert) + 1 % Pen/Strep

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller/Vertreiber
Absorptionsmessgerät <i>Sunrise Basic Microplate Reader</i>	Tecan, CH
Brutschrank <i>Hera Cell 240</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Durchflusszytometer FC500	Beckman Coulter, IN, USA

Fortsetzung Tabelle 11: Geräte

Elektroporator <i>MicroPulser</i>	Bio-Rad, CA, USA
Elektroporator <i>NEON Transfection System</i>	Invitrogen, CA, USA
Flüssigchromatographiesystem <i>ÄKTAPure 25</i>	GE Healthcare, WI, USA
Gelelektrophoresekammer (vertikal) <i>Mini-PROTEAN</i>	Bio-Rad, CA, USA
Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskop <i>IncuCyte SX1</i>	Sartorius, DE
Lichtmikroskop <i>Axiovert 40c/Axiostartplus</i>	Zeiss, DE
Lumineszenzmessgerät <i>1450 MicroBeta TriLux LSC & Luminiscence Counter</i>	Perkin Elmer, MA, USA
Magnetrührer <i>Hi-Mix S</i>	Heidolph Instruments, DE
Reinluftwerkbank <i>HeraSafe</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Rotationsinkubator <i>CERTOMAT BS-T</i>	Braun Biotech, DE
Stromversorgungsgerät <i>PowerPack HC</i>	Bio-Rad, CA, USA
Tischzentrifuge <i>Galaxy Mini</i>	VWR, DE
Tischzentrifuge <i>Heraeus Biofuge Pico</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Transferkammer (Immunblot) <i>Trans-Blot SD</i>	Bio-Rad, CA, USA
Transilluminator <i>Gel Doc XR</i>	Bio-Rad, CA, USA
Vortexgerät <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries, NY, USA
Zellzählkammer, Neubauer-Zählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld, DE
Zentrifuge <i>Heraeus Megafuge 1.0 R</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Tabelle 12: Computerprogramme

Programm	Hersteller/Vertreiber
<i>BioRender</i> (Online-Tool zur Erstellung wissenschaftlicher Abbildungen)	BioRender, CA, USA (https://www.biorender.com)
<i>Chem-Space</i> (Online-Tool zur Erstellung chemischer Strukturen)	Chem-Space, NJ, USA (https://chem-space.com/search)
<i>FlowJo 10.1</i>	Becton, Dickinson and Company, NJ, USA

Fortsetzung Tabelle 12: Computerprogramme

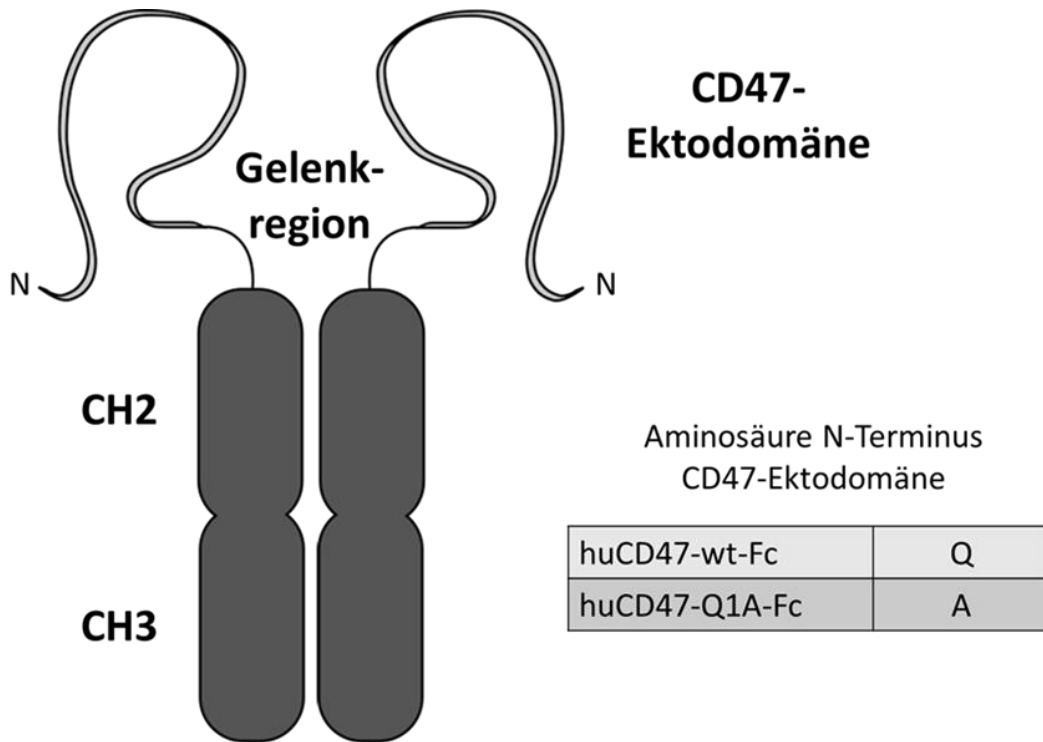
<i>Graphpad Prism 5.0</i>	Graphpad Software, CA, USA
<i>Inkscape 1.2.2</i>	Inkscape Community / Software Freedom Conservancy, MA, USA
<i>Kaluza 1.2 Analysis Software</i>	Beckman Coulter, IN, USA
<i>Microsoft Office 2013</i>	Microsoft Corporation, WA, USA
<i>SnapGene 6.1.1</i>	Dotmatics, MA, USA
<i>Zotero</i>	Roy Rosenzweig Center, VI, USA
<i>1450 MicroBeta Workstation Software</i>	Perkin Elmer, MA, USA

2.3 Molekularbiologische & biochemische Methoden

2.3.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für CD47-Fusionsproteine

Im Rahmen der Dissertation sollten Fusionsproteine, bestehend aus der nativen oder einer modifizierten Ektodomäne des Oberflächenmoleküls CD47 verbunden mit dem Fc-Teil eines humanen IgG1, hergestellt werden. Der Fc-Teil weist durch die Aminosäuresubstitutionen V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S keine Fc-Rezeptorbindung mehr auf (Sequenzursprung: Vafa et al.²²⁵). Die Sequenz der CD47-Ektodomäne entstammt der öffentlich zugänglichen Datenbank *National Library of Medicine* mit der Referenznummer NM_001777²²⁷.

Der schematische Aufbau des Proteins ist in Abbildung 9 (oben) dargestellt, die DNA-Sequenzen der Konstrukte sind im unteren Teil abgebildet. Bei der modifizierten Variante wurde die DNA-Sequenz der CD47-Ektodomäne in dem kodierenden Bereich für die erste Aminosäure nach dem Signalpeptid (türkis untermalt) so verändert, dass es zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin (Q) zu Alanin (Q1A) kommt. Folglich wurde das native Protein huCD47-wt-Fc und die modifizierte Variante huCD47-Q1A-Fc benannt. Die Konstrukte sollten in dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) vorliegen (Vektorkarte exemplarisch mit der huCD47-IgG1 σ -Insertion in Abbildung 10) und die Proteine in CHO-S-Zellen produziert werden. Da die *in silico* generierten Sequenzen bereits in dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) bereitgestellt werden konnten (Firma GeneArt Gene Synthesis/Thermo Fisher Scientific), entfielen darauffolgende Klonierungsschritte.



ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTXXXCTACT
 ATTTAATAAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGTAAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT
 TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGAAATTTAAAGGA
 AGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAG
 TGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG
 ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAA
 ACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTTCATGGTTTTCTCCA**GAGCCCAAATCTTGTGA**
CAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCGGCAGGGGCATCCTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCGCCGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
 CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
 TAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

- Weiß: CD47-Ektodomäne (inklusive Signalpeptid)
- Türkis: Triplet für Aminosäureaustausch (Glutamin: CAG, Alanin: GCG)
- Schwarz: Gelenkregion
- Dunkelgrau: CH2-Domäne hulgG1
- Hellgrau: CH3-Domäne hulgG1
- Rot: Terminationskodon

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Fusionsproteins bestehend aus der CD47-Ektodomäne und dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Moleküls (oben) und die dazugehörige DNA-Sequenz (unten).

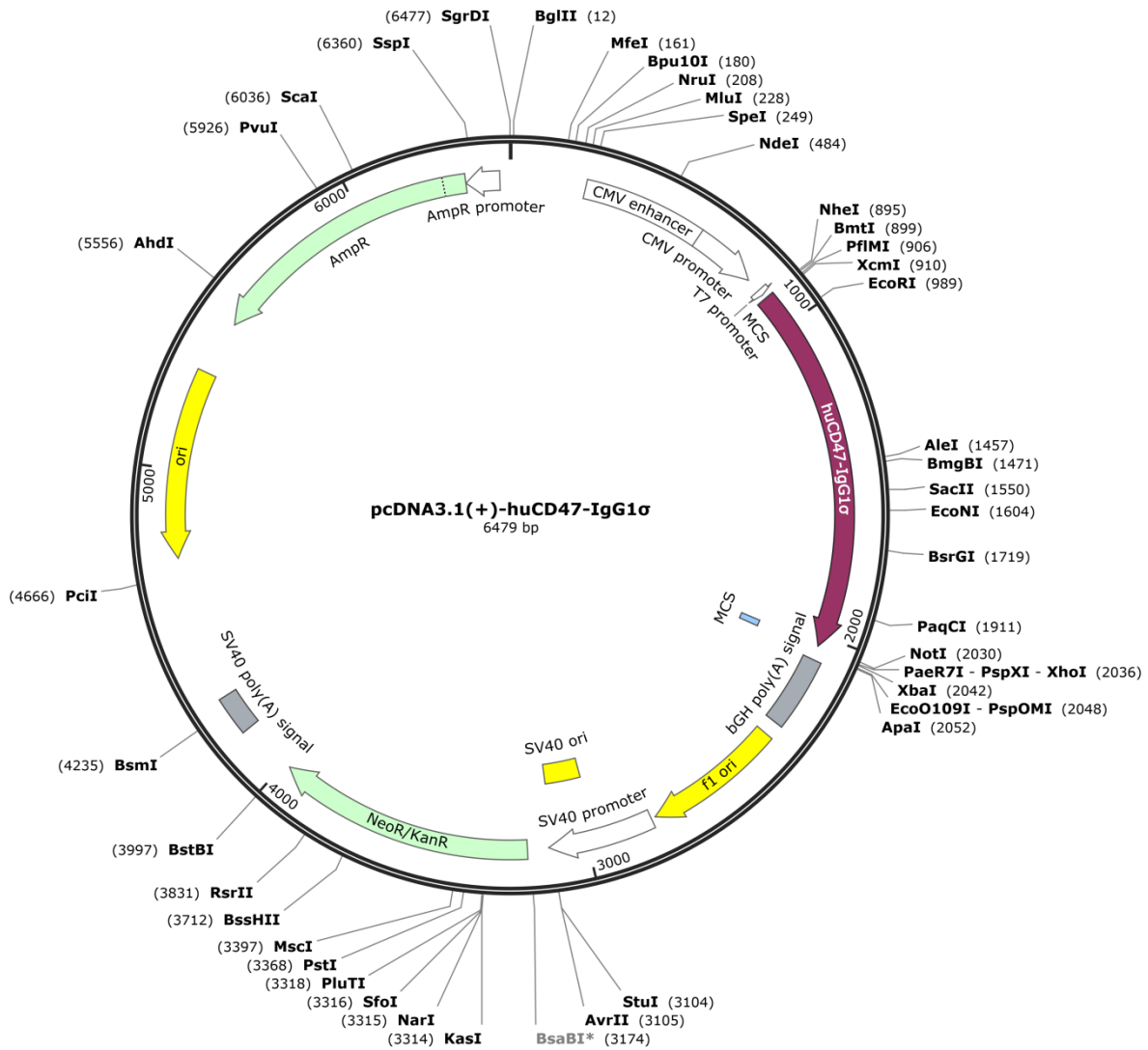


Abbildung 10: Exemplarische Vektorkarte pcDNA3.1(+) mit huCD47-IgG1 σ -Insertion; lila.

2.3.2 Plasmidamplifikation und Präparation endotoxinfreier DNA durch bakterielle Transformation

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden 50 μ l elektrokompente Bakterien (*E. Coli*, Stamm *XL-1 blue*, Stratagene, USA) mit 10 ng der zu amplifizierenden DNA (hier huCD47-IgG1 σ oder huCD47-Q1A-IgG1 σ in pcDNA3.1(+)) versetzt und für eine Minute bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Transfer der Bakterien-DNA-Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (*Gene Pulser Electroporation Cuvettes*, Bio-Rad, USA) mit sofortiger Elektroporation bei 1,8 kV (Elektroporator: *MicroPulser*, Bio-Rad, USA). Nach Hinzugabe von 500 μ l SOC-Medium (Invitrogen, USA) wurden 2 μ l der Bakteriensuspension auf mit Ampicillin versetzte (10 mg/ml) 2 x YT-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen folgte das Animpfen einer Vorkultur (4 ml 2 x YT + Ampicillin 10 mg/ml) mit einem isolierten Einzelklon der bewachsenen Agarplatten. Nach einer Inkubation für 6 h bei 37 °C (schüttelnd, 220 rpm) wurden die Bakterien in 300 ml 2 x YT plus Ampicillin (10 mg/ml) überführt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte abermals schüttelnd bei 37 °C über Nacht. Die endotoxinfreie Präparation der Plasmid-DNA wurde mit dem Isolationskit *NucleoBond Xtra Maxi EF* (Macherey-Nagel, DE) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.3 Affinitätschromatographie

Nach der Produktion in eukaryontischen CHO-S-Zellen (Kapitel 2.4.3) wurden die Fusionsproteine affinitätschromatographisch isoliert. Hierfür wurde das Kulturmedium, das die Fusionsproteine beinhaltet, in einem Zentrifugationsschritt bei 3345 x g (4 °C) für 15 min von den Zellen abgetrennt. Anschließend wurde die *CaptureSelect FcXL Affinity Matrix* (Thermo Fisher Scientific, USA) (1 ml pro 200 ml Zellmediumüberstand) bei 4 °C über Nacht eingerührt. Am nächsten Tag wurde die Matrix abzentrifugiert (836 x g, 4 °C, 10 min) und in eine PolyPrep-Chromatographiesäule (Bio-Rad, USA) überführt. Der sterile Überstand wurde für eine weitere Affinitätschromatographie bei 4 °C zwischengelagert. Nach zwei-maligem Waschen der Matrix mit kaltem PBS wurden die gebundenen Fusionsproteine durch Hinzugabe von 1 ml kaltem Elutionspuffer (0,1 M Glycin) in 200 µl kalte 1 M TRIS-Lösung (pH 8) eluiert. Der Elutionsschritt wurde zehnmal wiederholt, die einzelnen Fraktionen in Dialyseschläuche (Spectra/Por, Spectrum Labs, USA) gegeben und für zwei Tage in 2 l PBS, das täglich ausgetauscht wurde, dialysiert.

2.3.4 Größenausschlusschromatographie

In einem weiteren Reinigungsschritt lassen sich mögliche Aggregate von monomeren Fusionsproteinen über die Größenausschlusschromatographie isolieren. Hierbei wurden die Proteine mit Hilfe des *ÄKTAPure 25* Flüssigchromatographiesystems (GE Healthcare, USA) bei einer Flussrate von 0,8-1 ml/min nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine photometrisch bei 280 nm detektiert und in 2 ml-Fraktionen gesammelt. Eine graphische Auftragung der Absorption gegen das Elutionsvolumen ermöglichte die Identifikation der gewünschten Fraktionen mit monomeren Proteinen.

Die Konzentration der Proteinfraction wurde in einem nächsten Schritt mit einem BCA-Test (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific, USA) bestimmt.

2.3.5 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größe der Proteine kann durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem Gel und anschließender Färbung analysiert werden. Hierfür wurden zeh- und zwölfprozentige Polyacrylamidgele (Zusammensetzung s. Tabelle 3) präpariert und anschließend mit den zu analysierenden Proteinen (Fusionsproteine: 2 µg pro Spur, Zelllysate: 60 µg pro Spur) beladen. Für die Analyse von deglykosylierten CD47-Fusionsproteinen wurde zuvor der *Protein Deglycosylation Mix II* (NEB, USA) nach Herstellerangaben unter reduzierenden Bedingungen angewandt. Alle Proteine wurden mit 5x Ladebuffer (reduzierend bzw. nicht-reduzierend) versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Laufkammer (Bio-Rad, USA) in 1x SDS-Laufpuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 3) bei 120 V. Zur Identifizierung der Größe wurde zusätzlich ein Proteinstandard (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad, USA) aufgetragen. Die Proteinbanden konnten unter Einsatz einer Coomassiefärbung (*ROTIBlue*, Carl Roth, DE) visualisiert werden. Für den Transfer der Proteine auf Membranen in Immunblotversuchen wurden ungefärbte SDS-Gele verwendet.

2.3.6 Massenspektrometrische Analysen

Die erstellten CD47-Fusionsproteine wurden zur Identifikation der N-terminalen Aminosäuren in einem massenspektrometrischen Verfahren analysiert. Für die Probenvorbereitung wurden 17 µg des jeweiligen Proteins unter Verwendung des Deglykosylierungskits deglykosyliert und anschließend gelelektrophoretisch (2 µg Protein) der Größe nach aufgetrennt. Die relevanten Banden bei ca. 42 kDa konnten im Anschluss vorsichtig ausgeschnitten und zur weiteren Analyse versandt werden. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Oliver Valerius (Molekularbiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen).

2.3.7 Herstellung von Zelllysaten und Immunblotverfahren

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden 3×10^6 Zellen (hier MOLT-13 Ktrl., MOLT-13 QPCTL KO und MOLT-13 CD47 KO) mit NP40-Lysepuffer (Invitrogen, USA) nach Herstellerangaben lysiert. Zur Inhibition von Proteasen wurden zusätzlich PMSF (Sigma-Aldrich, USA) (Endkonzentration 1 mM) und ein Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, USA) nach Herstellerangabe hinzugefügt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet für 30 min bei 4 °C im Lysepuffer (30 µl) inkubiert. Während der Inkubation wurde die Zellsuspension alle 10 min durchmischt. Eine Trennung der Zelltrümmer vom Lysat erfolgte anschließend durch einen Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 4 °C, 10 min). Die Proteinkonzentrationen wurden im Anschluss mit einem BCA-Test bestimmt. Bis zur Verwendung wurden die Lysate bei -80 °C gelagert.

Für den Immunblot wurden die Proteine über eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (vgl. 2.3.5, 60 µg pro Spur) und anschließend unter Anwendung des *Semi-Dry-Immunblotverfahrens* (*Trans-Blot SD*, Bio-Rad, USA) auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Bio-Rad, USA) transferiert (90 min bei konstanten 20 A). Die Membran wurde im Anschluss für 1 h bei RT in einer Blockadelösung (1x TBS + 5 % Magermilchpulver) inkubiert und der HRP-gekoppelte QPCTL-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, USA, 0,4 µg/ml in Blockadelösung) hinzugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C unter konstanter Rotation wurde die Membran dreimal mit TBST-Pufferlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 3) gewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte durch Zugabe des Chemilumineszenzsubstrats (*SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat*, Thermo Fisher Scientific, USA) und Visualisierung in einem Transilluminator (*Gel Doc XR + Gel Documentation System*, Bio-Rad, USA). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Tubulin mit einem anti-β-Tubulin-Antikörper (Abcam, UK, 0,5 µg/ml in 1x TBS + 5 % Magermilchpulver) und anschließender Inkubation (1 h bei RT) mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG, Jackson ImmunoResearch, USA, 1:5000 in 1x TBS + 5 % Milchpulver).

2.3.8 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) zur Bestimmung der Bindungskapazitäten von CD47-Fusionsproteinen

Zur Qualitätskontrolle der löslichen CD47-Fusionsproteine wurde im ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) die Bindungskapazität an rekombinantes SIRP α und an CD47-Antikörpern überprüft. Hierfür wurden ELISA-Platten (*MaxiSorb ELISA-Plates*, Nunc, USA) mit der rekombinant hergestellten Ektodomäne des humanen SIRP α (SinoBiological, CN) oder mit den CD47-Antikörpern Klon CC2C6 (BioLegend, USA) bzw. Klon B6H12 (Thermo Fisher Scientific, USA) mit jeweils 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in PBS für 1 h bei RT beschichtet. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit ELISA-Waschpuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 3) wurden freie Bindungsstellen auf dem Plastikboden mit ELISA-Blockadepuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 3) für 1 h bei 37 °C abgedeckt. Es folgten weitere drei Waschschritte und die Hinzugabe der CD47-Fusionsproteine huCD47-wt-Fc oder huCD47-Q1A-Fc in unterschiedlichen Konzentrationen (0 $\mu\text{g/ml}$ – 50 $\mu\text{g/ml}$). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurden die nicht-gebundenen Moleküle herausgewaschen (drei Waschschritte). Zur Detektion der gebundenen Fusionsproteine wurde ein HRP-gekoppelter polyklonaler Ziege anti-human IgG-Antikörper (ImmunoReagents, USA, 1:5000) eingesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h bei RT und abermaligem Waschen wurde die Substratlösung (*TMB Substrate Solution*, Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangabe hinzugefügt. Die Absorbionsmessung (*Sunrise Basic Microplate Reader*, Tecan, CH) erfolgte bei 450 nm (540 nm Referenzwellenlänge) in Triplikaten.

2.3.9 Herstellung von Knock-Out-Mutanten mit der CRISPR/Cas-Methode

Die Herstellung von CD47- und QPCTL Knock-Out-Mutanten der humanen T-ALL-Zelllinie MOLT-13 fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Lorenz Bastian (Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel) statt. Es wurden synthetisch hergestellte sgRNAs (Synthego, USA) herangezogen, wobei je Gen (QPCTL bzw. CD47) zwei sgRNAs verwendet wurden, die unterschiedliche Bereiche der DNA binden.

QPCTL_1: 5'GCUUCCGAUCAAAUGGGACCU3'
QPCTL_2: 5'UAAGUGCUCCAGAGACGCUG3'
CD47_1: 5'AUGCUUUGUUACUAAUAUGG3'
CD47_2: 5'AAUAGUAGCUGAGCUGAUCC3'

Je Transfektionsansatz wurden $0,15 \times 10^6$ MOLT-13-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in 11 μl Elektroporationspuffer R (*NEON Transfection System*, Invitrogen, USA) aufgenommen. Nach Zusammenfügen der zu transfizierenden sgRNAs mit dem Cas9-Protein in einem finalen Volumen von 2 μl je Ansatz (1,2 μl Cas9 [5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] + 0,4 μl sgRNA_1 [1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] + 0,4 μl sgRNA_2 [1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]) und einer Inkubation für 10 min bei RT wurden die sgRNA-Cas9-Komplexe den Zielzellen hinzugefügt. Es folgte die Elektroporation mit dem *NEON Transfection System* (Invitrogen, USA) mit einer sofortigen Überführung der Zellen in serumhaltiges Zellkulturmedium und einer Inkubation bei 37 °C bis zur Vereinzelnung der Klone. Ein erfolgreicher Knock-Out konnte für CD47 über eine durchflusszytometrische Messung (vgl. Kapitel 2.4.4) und für QPCTL im Immunblotverfahren (vgl. Kapitel 2.2.6) nachgewiesen werden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Solide Tumorzelllinien wachsen vornehmlich adhären. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % - 80 % wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA oder Accutase (Gibco / Life Technologies, USA) vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 535 x g (RT) wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Dichte der Suspensionstumorzelllinien wurden alle zwei bis drei Tage auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in frischem Zellkulturmedium eingestellt.

2.4.2 Behandlung von Tumorzellen mit SEN177 oder *all-trans* Retinsäure (ATRA)

Solide Tumorzelllinien wurden mit der niedermolekularen Substanz SEN177 (gelöst in DMSO, Sigma Aldrich, USA) behandelt, um die Isoglutaminylylase selektiv zu inhibieren. Hierbei wurden $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml unter sterilen Bedingungen ausgesät und mit der entsprechenden Konzentration an SEN177 (0 – 50 μM) für 24 h bis 72 h behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO (volumenäquivalent zur maximalen SEN177-Konzentration) versetzt.

Zur Erhöhung der Expression von CD38 auf der T-ALL-Zelllinie HSB-2 wurden die Zellen mit dem Vitamin A-Derivat *all-trans* Retinsäure (ATRA) (gelöst in DMSO, Sigma Aldrich, USA) behandelt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und mit ATRA in Konzentrationen zwischen 0 nM und 1000 nM für 24 h bis 72 h versetzt. Als Kontrolle diente ebenfalls eine Behandlung mit DMSO (volumenäquivalent zur maximalen ATRA-Konzentration).

2.4.3 Produktion von CD47-Fusionsproteinen in CHO-S Zellen

Die CD47-Fusionsproteine wurden in CHO-S-Zellen unter Einsatz des *MaxCyte STx* Elektroporationssystem (MaxCyte, USA) produziert. Für die Transfektion eines Proteins wurden 8×10^6 Zellen benötigt, wobei diese zuvor ca. zwei Wochen in serumfreiem CD-CHO Medium (vgl. Tabelle 9, Gibco/Life Technologies, USA) bei 37 °C schüttelnd (145 rpm) kultiviert und alle drei Tage auf eine Zelldichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml passagiert wurden. Um am Tag der Transfektion eine gewünschte Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml zu erreichen, mussten die Zellen am Tag vor der Transfektion auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt werden. Nach einem Aufteilen der Zellen in zehn Transfektionsansätze (plus einem GFP-Ansatz als Transfektionskontrolle) und einmaligem Waschen mit Elektroporationspuffer (MaxCyte, USA) wurden die Zellen in jeweils 400 μl Elektroporationspuffer aufgenommen. Nach Hinzugabe von 120 μg der entsprechenden Plasmid-DNA (huCD47-IgG1 σ bzw. huCD47-Q1A-IgG1 σ oder GFP) konnte die Elektroporation in einer Küvette (OC-400, MaxCyte, USA) erfolgen. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in einem Well einer 6-Well-Platte gesammelt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und in 150 ml CD-OptiCHO Medium (Gibco/Life Technologies, USA) aufgenommen. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C (schüttelnd, 145 rpm). Am Tag nach der Transfektion wurde die Temperatur auf 32 °C herabgesenkt und einmalig 1 mM Natriumbutyrat zur Inhibition der Zellteilung hinzugegeben.

Bis zum Beenden der Produktion bei einer Vitalität <50 % (hier nach neun Tagen) wurden die Zellen täglich mit 5,25 ml MaxCyte-Futterlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 3) versorgt. Zudem fand ein tägliches Monitoring der Zellvitalität und der Zellzahl statt. Die nachfolgenden Schritte zur Gewinnung und Reinigung der Proteine sind bereits in den Abschnitten 2.3.3 und 2.3.4 zusammengefasst.

2.4.4 Durchflusszytometrie zum Nachweis von Oberflächenproteinen und Bestimmung der Bindung von Antikörpern

Die Expression von Antigenen auf der Oberfläche von Zellen sowie die Bindungskapazitäten monoklonaler Antikörper und der CD47-Fusionsproteine konnten mit Hilfe indirekter Färbungen in durchflusszytometrischen Experimenten bestimmt werden. Hierbei wurden $0,15 \times 10^6$ Zellen/Well in einer 96-Well-Platte (Sarstedt, DE) mit 100 μ l FACS-Puffer dreimal gewaschen und anschließend der Primärantikörper bzw. das Fusionsprotein in gegebener Konzentration (Konzentration in korrespondierender Abbildung bzw. Bildunterschrift angegeben, in 50 μ l PBS gelöst) hinzugefügt. Als Kontrolle diente ein nicht-bindender muriner oder humaner Antikörper. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4 °C und abermaligem Waschen wurde der korrespondierende Sekundärantikörper (anti-human Kappa FITC 1:20, anti-human IgG FITC/PE 1:50, anti-human IgA FITC 1:50) in einem Volumen von 50 μ l hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 1 h (4 °C). Anschließend wurden die nicht-gebundenen Moleküle über drei Waschschriffe entfernt, die Zellen in 400 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in 5 ml Probenröhrchen überführt. Für die Bestimmung der Moleküldichte pro Zelle wurde das QIFIKIT (Dako, DK) nach Herstellerangaben angewandt. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte am Durchflusszytometer (FC500, Beckman Coulter, USA) bei 520 nm, die Auswertung der Daten unter Zuhilfenahme des Programms *KALUZA Analysis Software 1.2* (Beckman Coulter, USA) oder *FlowJo 10.1* (Becton, Dickinson and Company, USA).

2.4.5 Messung des Zellwachstums

Die Messung des Zellwachstums basiert auf der Verstoffwechslung des Tetrazolimsalzes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) zu Formazan und ist äquivalent zur Anzahl vitaler Zellen.²²⁸ In der vorliegenden Arbeit

diente der Test sowohl zur Bestimmung der Vitalität solider Tumorzellen nach Behandlung mit SEN177 als auch zum Nachweis der Cetuximab-vermittelten direkten Effekte auf DiFi-Zellen. Zunächst wurden die Tumorzellen mit einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml (2×10^4 Zellen/Well) in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an SEN177 oder DMSO als Kontrolle für 72 h behandelt. Die Hinzugabe des MTS (Promega, USA) erfolgte nach Herstellerangabe. Nach der Absorptionsmessung bei 490 nm (*Sunrise Basic Microplate Reader*, Tecan, CH) wurde die prozentuale Vitalität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellwachstum \%} = \frac{\text{Absorption mit SEN177 bzw. CTX}}{\text{Absorption ohne SEN177 bzw. CTX}} \times 100$$

2.4.6 Isolierung von Effektorzellen, Präparation von humanem Serum aus peripherem Blut und Generierung von Makrophagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Effektorzellen als auch das humane Serum wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert.

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden Leukozytenreduktionskammern (LRSC) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Kiel, verwendet. Hierbei wurde zunächst das in der Kammer enthaltene Blut auf 40 ml mit PBS verdünnt und davon anschließend 10 ml vorsichtig auf 10 ml Ficoll-Lösung (*Ficoll-Paque Plus*, Cytiva, USA) geschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt bei $1306 \times g$ für 20 min ohne Bremse (RT) konnte der PBMC-Ring unter Verwendung einer serologischen Pipette abgenommen und nach Auffüllen auf 50 ml mit PBS gewaschen werden (Zentrifugation bei $677 \times g$, 5 min, RT). Die noch enthaltenen Erythrozyten wurden unter hypotonen Bedingungen durch die Hinzugabe von kaltem dH₂O (hier 45 ml) für 30 Sekunden lysiert, zur Wiederherstellung einer isotonen Lösung wurde anschließend 10x PBS (hier 5 ml) hinzugegeben.

Die mononukleären Zellen wurden für ⁵¹Chromfreisetzungstests herangezogen oder es folgten weitere Schritte zur Generierung von Makrophagen oder NK-Zellextraktion. Die Isolierung von NK-Zellen erfolgte über eine Magnetseparation (MACS) unter Verwendung des NK-Zell-Isolationskits (Miltenyi Biotec, DE) nach Herstellerangaben. Nach einer Kultivierung über Nacht bei 37 °C in Zellkulturmedium konnten die Zellen im ⁵¹Chromfreisetzungstest eingesetzt werden.

Für die Isolierung von Neutrophilen wurden 7 ml unverdünntes Vollblut auf 5 ml Polymorphpreplösung (ProteoGenix, FR) geschichtet und anschließend ein Zentrifugationsschritt bei 836 x g (30 min, RT, ohne Bremse) durchgeführt. Mit einer serologischen Pipette konnte die Neutrophilenfraktion entnommen und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt werden. Nach dem Waschschrift (677 x g, 5 min, RT) wurden die zurückgebliebenen Erythrozyten lysiert (s.o.).

Für die Isolierung des humanen Serums wurde peripheres Blut in Monovetten für 30 min auf Eis zum Agglutinieren gebracht und die zellulären Bestandteile im Anschluss mittels Zentrifugation (836 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Das Serum konnte anschließend im ⁵¹Chromfreisetzungstest eingesetzt oder bei -80 °C gelagert werden.

Von Monozyten abstammende Makrophagen konnten durch Adhärenz mononukleärer Zellen generiert werden. Hierbei wurden 50 x 10⁶ PBMC in 5 ml *Monocyte Attachment Medium* (PromoCell, DE) resuspendiert und in eine *EasYFlask* Zellkulturflasche (Nunc, USA) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurden nicht-adhärenzte Zellen entfernt und die adhärenzten Zellen in X-VIVO 15-Zellkulturmedium (Lonza, CH) bei 37 °C kultiviert. Zur Generierung des unpolarisierten M0-Typus wurden 50 ng/ml M-CSF (PeproTech, USA) am Folgetag zugegeben. Das Zellkulturmedium mit frischem M-CSF wurde alle drei Tage erneuert. Vor Einsatz in Experimenten wurden die Makrophagen mindestens zehn Tage in Kultur gehalten.

2.4.8 Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose

Die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose wurde sowohl über manuelle Auszählung als auch im späteren Verlauf der Arbeit mittels automatisierter Hochdurchsatz-fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Für die manuelle Auszählung wurden Tumorzellen zunächst unter Verwendung vom Carboxyfluoresceinsuccinimidylester CSFE (*CSFE Cell Division Tracker Kit*, Biolegend, USA) nach Herstellerangaben markiert. Die Makrophagen wurden durch Inkubation mit 5 ml Zelldissoziationspuffer für 20 min bei 37 °C (Gibco/Life Technologies, USA) vom Flaschenboden gelöst, pelletiert (535 x g, 5 min, RT), auf 4 x 10⁴ Zellen/ml in X-VIVO 15 eingestellt und für 30 min bei RT zum Adhärenzieren in μ -slide-Platten (Ibidi, DE) gebracht. Nach Hinzugabe der

einzusetzenden Antikörper in der entsprechenden Konzentration wurden die Tumorzellen in einem Effektor- zu Tumorzell (E:T)-Verhältnis von 1:2 hinzugegeben und die Co-Kultur für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die manuelle Auszählung der fluoreszenzmarkierten, phagozytierten Tumorzellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm (Emissionswellenlänge; 517 nm). Der phagozytische Index (PI) wurde nach folgender Formel berechnet (Auszählung von mindestens 50 Makrophagen):

$$\text{phagozytischer Index} = \frac{\text{Anzahl phagozytierte Tumorzellen}}{\text{Anzahl Makrophagen}} \times 100$$

Bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose über die automatisierte Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie wurden die Tumorzellen (1×10^6 Zellen/ml in PBS) mit dem pH-sensitiven Fluorophor pHRodo (0,5 µg/ml, Invitrogen, USA) für 1 h bei RT unter Lichtausschluss markiert. Zum Herauswaschen des überschüssigen Farbstoffes wurden die Tumorzellen mit dem fünffachen Volumen an Zellkulturmedium versetzt und zentrifugiert (535 x g, 5 min, RT). Nachdem die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen wurden, wurde die Zellzahl auf $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml in X-VIVO 15 eingestellt. Die abgelösten Makrophagen (s.o.) wurden mit einer Konzentration von $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml (2×10^4 Zellen pro Well) in einer 96-Well-Platte für 30 min inkubiert um zu adhären. Anschließend konnten die Antikörper in der gegebenen Konzentration hinzugefügt werden. Der Start der Phagozytose erfolgte nach Hinzugabe der Tumorzellen (2×10^4 Zellen pro Well) in einem E:T-Verhältnis von 1:1.

Zur Bestimmung der basalen Phagozytose wurden ebenfalls Wells mit Tumorzellen plus Makrophagen ohne Antikörper und für die Hintergrundfluoreszenz die Tumorzellen alleine vorbereitet. Die Messung erfolgte im *IncuCyte System* (Sartorius, DE). Dabei wurden im Abstand von jeweils 20 min über einen Zeitraum von fünf Stunden mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen gemacht, die mit der *IncuCyte Basic Analysis Software* (Sartorius, DE) analysiert werden konnten. Dabei kam es zur Ermittlung der Anzahl an rot fluoreszierenden Objekten pro Bild (*red fluorescent objects per image, ROI*), die die phagozytierten Tumorzellen darstellen. Die Werte der Hintergrundfluoreszenz wurden durch Einstellung der Mindestfluoreszenzintensität herausgerechnet, um die spezifische Phagozytose abzubilden.

2.4.9 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizitäten und komplementabhängige Zytotoxizität in ⁵¹Chromfreisetzungstests

Die antikörperabhängige zellvermittelte als auch komplementabhängige Zytotoxizität wurde in ⁵¹Chromfreisetzungstests bestimmt. Hierfür wurden $0,6 \times 10^6$ Tumorzellen in $50 \mu\text{l}$ ⁵¹Chrom (als Natriumchromat gelöst in 1xPBS) für 2 h bei 37 °C radioaktiv markiert. Das überschüssige ⁵¹Chrom konnte durch Hinzugabe von Zellkulturmedium mit einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei $535 \times g$ für 5 min (RT) entfernt werden. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Tumorzellen auf eine Zellzahl von $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturmedium eingestellt und davon $50 \mu\text{l}$ (entspricht 5×10^3 Tumorzellen) in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Als Effektoren dienten GM-CSF (50 U/ml) stimulierte Neutrophile (E:T = 40:1 und 80:1), NK-Zellen (E:T = 10:1), PBMC (E:T = 40:1) oder humanes Serum (25 % v/v). Zusammen mit den Antikörpern betrug das Endvolumen pro Well 200 μl .

Für die Bestimmung einer maximalen Lyserate wurden Tumorzellen mit 2 %-iger Triton X-Lösung versetzt, die basale Lyserate wurde durch Co-Kultivierung von Effektoren und Tumorzellen ohne Antikörperzusatz ermittelt. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C wurden die Zellen bzw. Zelltrümmer bei $836 \times g$ für 5 min (RT) pelletiert und $25 \mu\text{l}$ des ⁵¹Chrom enthaltenden Überstandes in $150 \mu\text{l}$ Szintillationslösung *Optiphase HiSafe 3* (PerkinElmer, USA) überführt.

Es folgte eine weitere Inkubation für 15 min (schüttelnd bei RT) bis die entstandenen Lichtsignale im Lumineszenzmessgerät *1450 MicroBeta TriLux LSC & Luminescence Counter* (Perkin Elmer, USA) als *counts per minute* (cpm) gemessen wurden. Die prozentuale Lyse lässt sich anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Lyse \%} = \frac{\text{cpm experimentelle Lyse} - \text{cpm basale Lyse}}{\text{cpm maximale Lyse} - \text{cpm basale Lyse}} \times 100$$

2.5 *In vivo*-Experimente

Zur Ermittlung des Einflusses einer Isoglutaminylyklaseinhibition in der antikörperbasierten Tumormimmuntherapie im lebenden Organismus wurden *in vivo*-Experimente in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jeanette H. W. Leusen (Universitätsklinikum Utrecht, NL)

durchgeführt. Die Tierversuche fanden nach internationalen Richtlinien mit Zustimmung des Tierethikausschusses der Universität Utrecht statt (AVD15002016410).

Männliche und weibliche Mäuse im SCID-Hintergrund wurden im zentralen Tierhaus der Universität Utrecht unter kontrollierten Temperaturbedingungen mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h zu 12 h und einer uneingeschränkten Trinkwasser- und Futterzufuhr gehalten. Sowohl nicht-transgene (nTg, CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcrIcoCrI, Charles River, USA) als auch transgene SCID-Mäuse, die den humanen Fc α -Rezeptor tragen (CD89 Tg)²²⁹, wurden mit einem Alter zwischen 11 Wochen und 34 Wochen in den Experimenten eingesetzt. Nicht-transgene SCID-Mäuse konnten dabei für Versuche mit IgG-Molekülen herangezogen werden, während die Testung der IgA-Moleküle in CD89 Tg SCID-Mäusen stattfand.

Die EGFR-positiven Tumorzielzellen (MDA-MB-468) wurden für 72 h mit SEN177 (10 μ M) oder DMSO vorbehandelt und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff *CellTrace Violet* (4 μ M, Invitrogen, USA) für 15 min bei RT markiert. Unbehandelte, murine EGFR-negative Ba/F3-Zellen wurden ebenfalls mit dem Fluorophor *CellTrace Violet* (0,125 μ M, Invitrogen, USA) gefärbt. Pro Maus wurden Zellen in einem Verhältnis von 5:1 (MDA-MB-468:Ba/F3) und einer Gesamtzellzahl von 6×10^6 intraperitoneal injiziert. Direkt nach Inokulation der Zellen wurden die Mäuse mit den Antikörpern CTX bzw. PANI oder CTX-IgA2 mit jeweils 100 μ g für 16 h therapiert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS in dafür vorgesehene Kontrolltiere.

Nach Ablauf von 16 Stunden wurden alle Tiere (fünf pro Gruppe) euthanasiert, die verbliebenen Zellen aus der Bauchhöhle gewaschen und das Verhältnis von MDA-MB-468- zu Ba/F3-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Durch Färbung der Ba/F3-Zellen mit einer geringeren Konzentration an *CellTrace Violet* als bei der MDA-MB-468 verwendeten Konzentration konnten diese anhand schwacher Fluoreszenzwerte leicht von den MDA-MB-468-Zellen unterschieden werden.

2.6 Statistische Analysen

Die graphische und statistische Auswertung der generierten Daten erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 5* (GraphPad, USA). Dabei wurden die Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) oder als individuelle Einzelwerte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede mit p-Werten $< 0,05$ wurden

mittels einfaktorieller bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur oder zweiseitigem t-Test (ungepaart) ermittelt. Der jeweils angewandte Test ist in der korrespondierenden Bildunterschrift angemerkt.

3. Ergebnisse

Die Interaktion zwischen CD47 auf Tumorzellen und dem Rezeptor SIRP α auf myeloischen Zellen führt zu einer Inhibition der Effektorzellen und beeinträchtigt somit die Eliminierung des Tumors durch die körpereigenen Immunzellen. Die Kombination aus einer CD47-SIRP α -Blockade mit einer antikörperbasierten Tumorimmuntherapie zur effektiven Aktivierung myeloischer Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

3.1 CD47-SIRP α -Interaktion

3.1.1 CD47-Expression auf Tumorzellen

Tumorzellen sind in der Lage durch unterschiedliche Mechanismen einer Immunabwehr zu entkommen. Eine Überexpression des Oberflächenmoleküls CD47, als Ligand für den inhibitorischen Rezeptor SIRP α , kann dazu führen, dass myeloische Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen inhibiert werden.

Um den Einfluss einer CD47-Blockade auf die Aktivierung myeloischer Zellen zu untersuchen, wurden Tumorzelllinien mit unterschiedlicher CD47-Expression eingesetzt. Während vor allem die solide Karzinomzelllinie A431 im Vergleich zu den anderen verwendeten Tumorzelllinien viel CD47 exprimiert, wurden intermediäre Expressionen bei der T-ALL-Zelllinie P12-ICHIKAWA und den beiden Karzinomzelllinien MDA-MB-468 und Kyse-30 ersichtlich. Die ebenfalls der T-ALL zugehörigen Zelllinien HSB-2 und MOLT-13 wiesen die geringste CD47-Expression auf (Abbildung 11).

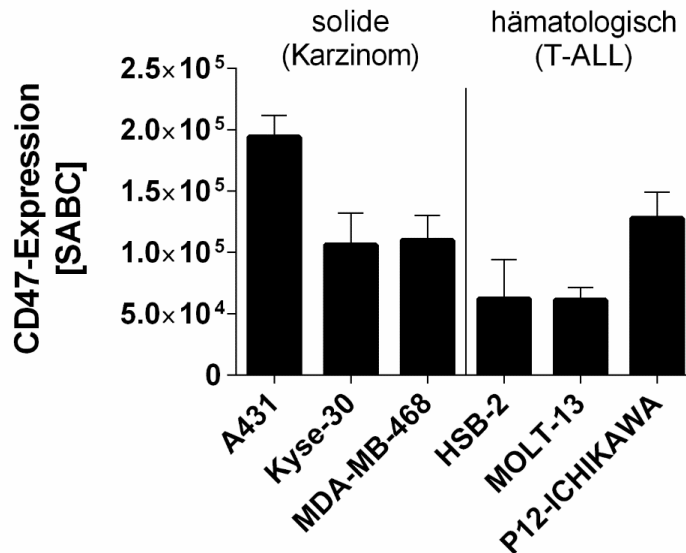


Abbildung 11: CD47-Expression auf den verwendeten soliden und hämatologischen Tumorzelllinien.

Die CD47-Expression der Karzinomzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 als auch der T-ALL Zelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA wurde mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt und die spezifischen Antigenbindungsstellen pro Zelle (specific antigen binding sites per cell, SABC) unter Verwendung des QIFIKIT[®] ermittelt. Eingesetzt wurde der CD47-Antikörper B6H12 unter sättigenden Bedingungen (10 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

3.1.2 Expression von Fc-Rezeptoren und SIRPα auf myeloischen Zellen

Die Voraussetzung für eine Aktivierung von Immunzellen über Antikörper ist die Expression von aktivierenden Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die hier verwendeten myeloischen Zellen, Makrophagen und Neutrophile, wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert bzw. generiert.

Unpolarisierte Makrophagen (M0-Typus) zeigten dabei eine erhöhte Expression der aktivierenden Fcγ-Rezeptoren CD32a und CD64 im Vergleich zu CD16 und CD32b. Auch der aktivierende Fcα-Rezeptor CD89 ist auf Makrophagen exprimiert (Abbildung 12 A). Im Gegensatz dazu exprimieren Neutrophile in hohem Maße CD16, wobei es sich in diesem Fall ausschließlich um den *decoy*-Rezeptor CD16b handelt.⁵⁶ Zusätzlich zu CD32a exprimieren auch Neutrophile den IgA-bindenden Fcα-Rezeptor CD89 (Abbildung 12 A).

Zum Schutz einer unkontrollierten Überaktivierung exprimieren myeloische Zellen Immuncheckpoint-Moleküle, wie z. B. SIRPα. Der inhibitorische Rezeptor SIRPα wurde sowohl von den in dieser Arbeit verwendeten Makrophagen als auch von Neutrophilen exprimiert, wobei die Fluoreszenzintensitätswerte bei den Makrophagen wesentlich höher lagen verglichen mit denen der Neutrophilen (Abbildung 12 B).

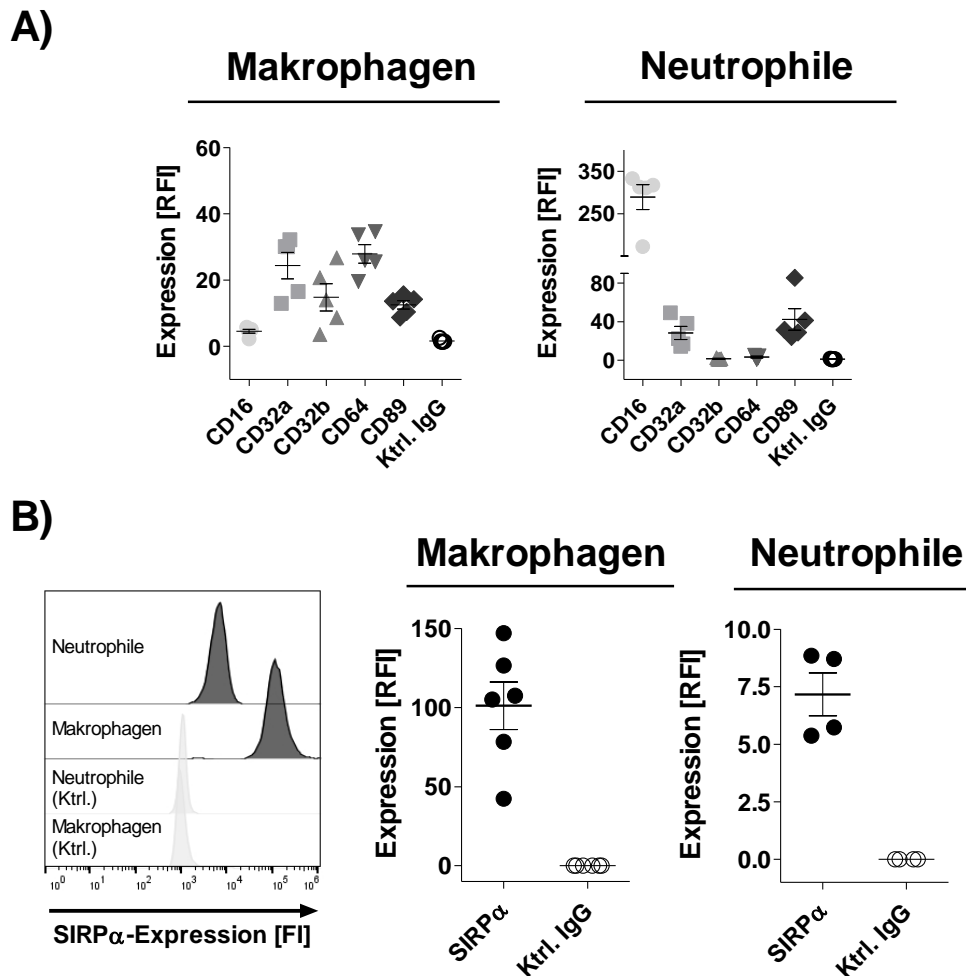


Abbildung 12: Expression von Fc-Rezeptoren und SIRP α auf humanen Makrophagen und Neutrophilen. Die Expression der Fc-Rezeptoren CD16, CD32a, CD32b, CD64 und CD89 (A) und SIRP α (B) auf humanen Makrophagen (M0-Typus) und Neutrophilen wurde mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt und die Bindung mit FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG F(ab')₂-Fragmenten detektiert (CD16: Klon 3G8, CD32a: Klon IV.3, CD32b: Klon S18005H, CD64: Klon 4A10-1, CD89: Klon A59, SIRP α : Klon 15-414, Ktrl. IgG = muriner IgG1: Klon MOPC-21). Dargestellt sind die einzelnen Experimente plus Mittelwert \pm SEM sowie ein exemplarisches Histogramm der SIRP α -Expression auf Makrophagen und Neutrophilen eines Spenders. RFI = relative Fluoreszenzintensität.

3.2 Untersuchungen zur Rolle des N-terminalen Pyroglutamats

Eine Induktion des *don't eat me*-Signals über SIRP α erfolgt nach Bindung seines Liganden CD47. Die Bindung scheint dabei maßgeblich von dem Vorliegen eines Pyroglutamats am N-Terminus des CD47 abzuhängen.¹⁸⁷ Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss des N-terminalen Pyroglutamats auf die Bindungsaktivität genauer betrachtet werden.

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung unterschiedlicher CD47-Fusionsproteine

Um den Einfluss des N-terminalen Pyroglutamats zu untersuchen, wurden zwei Fusionsproteine erstellt: huCD47-wt-Fc und huCD47-Q1A-Fc. Diese bestanden aus einem mutierten Fc-Teil eines IgG1, der keine Fc-Bindung aufweist²²⁵ und entweder der nativen Ektodomäne des CD47 (huCD47-wt-Fc) oder einer modifizierten Ektodomäne, bei der ein Aminosäureaustausch (Glutamin zu Alanin, Q1A) die Ausbildung eines N-terminalen Pyroglutamats verhindern sollte (huCD47-Q1A-Fc). Die ausgehend von der Aminosäuresequenz (vgl. Material & Methoden Punkt 2.3.1) errechnete durchschnittliche Masse des monovalenten Moleküls (ein Bindungsarm) liegt bei 42,4 kDa.

3.2.1.1 Produktion und biochemische Charakterisierung

Die Fusionsproteine wurden in CHO-S- (engl. *Chinese hamster ovary*) Zellen produziert. Unter Zuhilfenahme des *MaxCyte STx* Systems wurden die kodierenden Plasmide mittels Elektroporation in die Zellen transfiziert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Plasmid kodierend für das Reporterogen GFP eingebracht, dessen Fluoreszenz sich 24 h nach Transfektion durchflusszytometrisch bestimmen ließ (Abbildung 13).

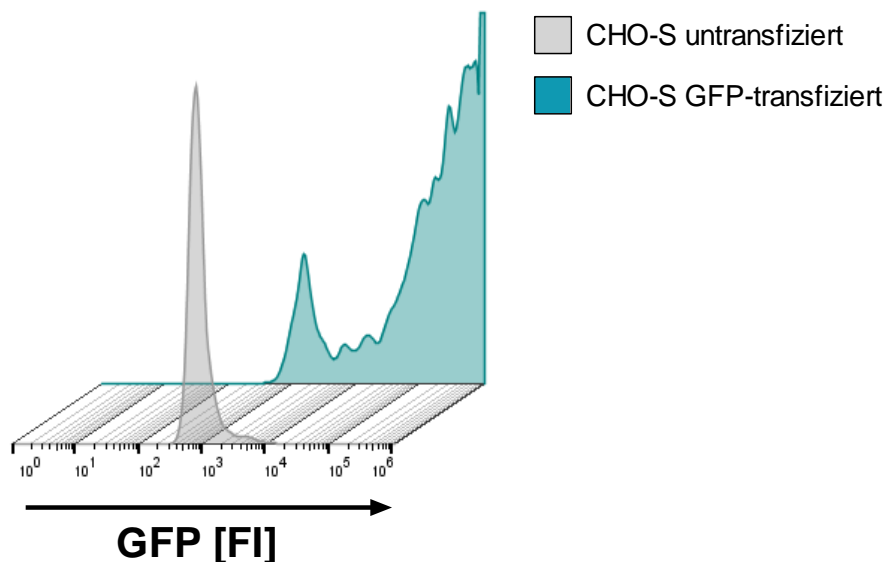


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung von untransfizierten und GFP-transfizierten CHO-S-Zellen. Die Effizienz der Transfektion wurde 24 h nach Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt. Mediane Fluoreszenzintensitäten von $0,9 \times 10^3$ bei den untransfizierten CHO-S-Zellen (grau) und $1,05 \times 10^6$ bei den GFP-transfizierten Zellen (türkis) wurden ermittelt. FI = Fluoreszenzintensität.

Nach einer neuntägigen Kultivierung wurden die Fusionsproteine affinitätschromatographisch über den Fc-Teil (*CaptureSelect IgG Fc XL Matrix*) aus dem Zellkulturüberstand extrahiert und anschließend die vollständig assemblierten Fusionsproteine über eine Größenausschlusschromatographie isoliert (Elutionsvolumen: 170 ml, Abbildung 14). Die Proteinkonzentrationen beider Fusionsproteine wurden im BCA-Test bestimmt.

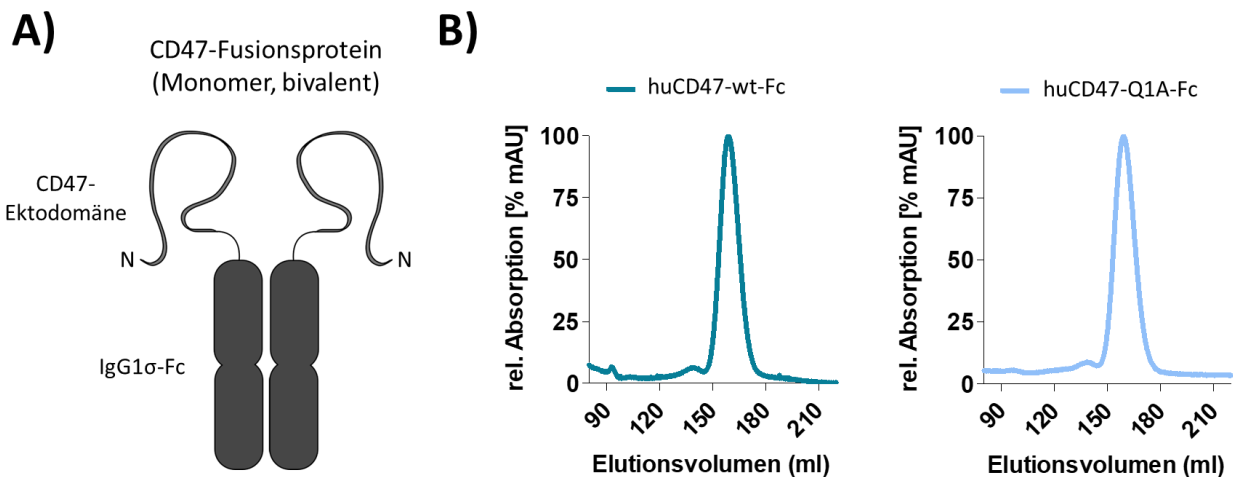


Abbildung 14: Größenausschlusschromatographie von CD47-Fusionsproteinen.

A) Schematische Darstellung eines monomeren, bivalenten CD47-Fusionsproteins. B) Gezeigt sind die Elutionsprofile der monomeren, bivalenten CD47-Fusionsproteine huCD47-wt-Fc (links) und huCD47-Q1A-Fc (rechts) nach Affinitätschromatographie mit Fc-gerichteter Sepharosematrix (anti-human IgG Fc XL). mAU = milli Absorptionseinheit.

Die Assemblierung als auch die Molekülgrößen konnten im Anschluss über die SDS-PAGE und Coomassiefärbung gezeigt werden (Abbildung 15). Bei den nicht-reduzierten Proteinen lagen die Banden bei ca. 150 kDa (vollständig assembliert, zweiarmig), während die reduzierten Proteine eine Masse von ca. 60 kDa aufwiesen (einarmig, monovalentes Fusionsprotein, Abbildung 15 links).

Das erhöhte Molekulargewicht bei der Gelelektrophorese im Vergleich zum berechneten Gewicht (60 kDa vs. 42,4 kDa) resultiert aus der Glykosylierung des Proteins (Abbildung 15 rechts). In der nicht-reduzierten Fraktion sind des Weiteren keine Banden bei ca. 60 kDa zu verzeichnen, was darauf schließen lässt, dass nur vollständig zusammengefügte Fusionsproteine isoliert wurden. Die zusätzlichen Banden bei ca. 32 kDa in den deglykosylierten Proben stellt das im Deglykosylierungskit enthaltene Enzym PNGase F dar.

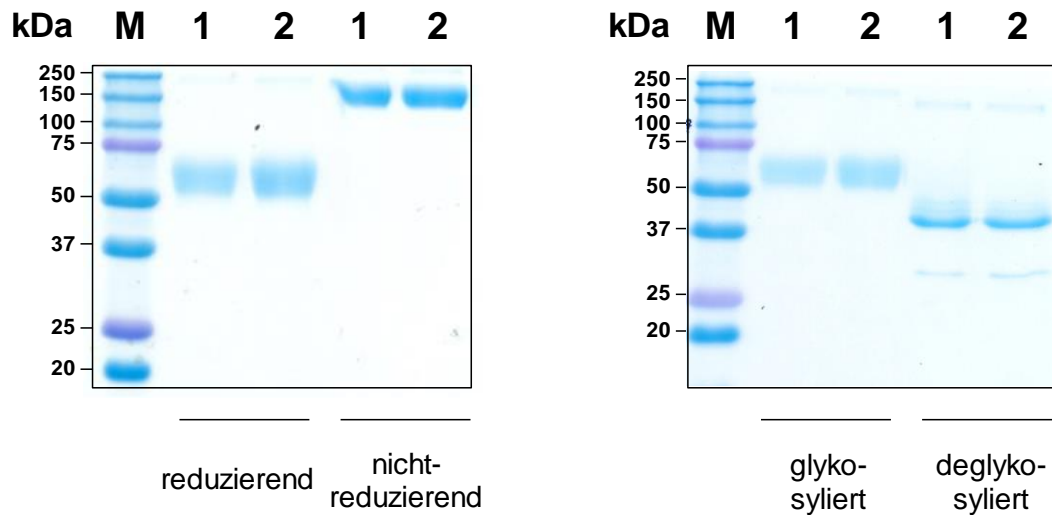
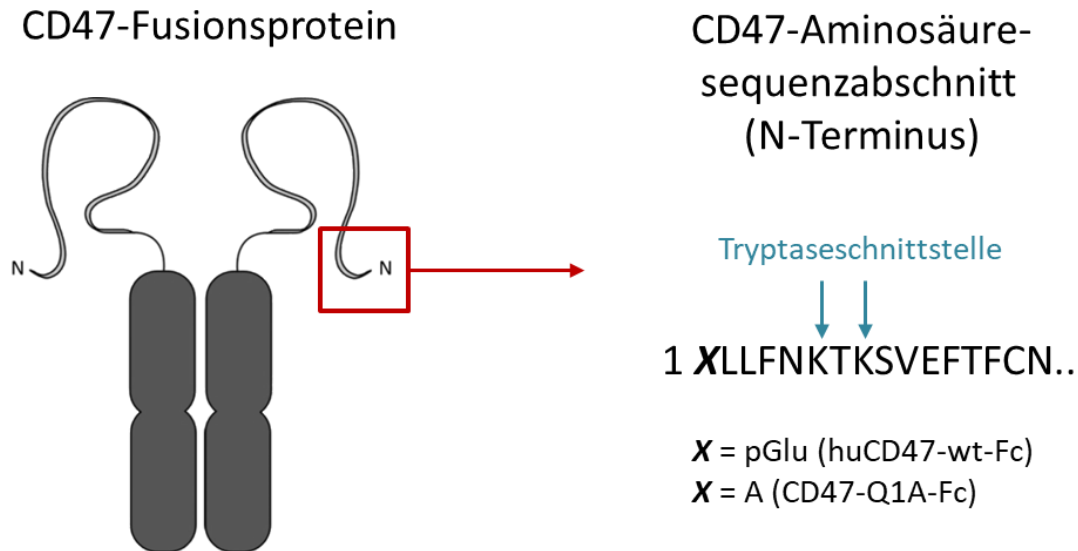


Abbildung 15: Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CD47-Fusionsproteinen.

Die CD47-Fusionsproteine huCD47-wt-Fc (1) und huCD47-Q1A-Fc (2) wurden in der SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid) nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Der Vergleich zwischen reduziertem und nicht-reduziertem Protein ist links dargestellt. Reduzierte Proteine mit und ohne Glykosylierung sind auf der rechten Seite abgebildet. Auftragsmenge = 2 µg pro Fusionsprotein, M = Marker, kDa = Kilodalton.

Als Resultat lässt sich festhalten, dass sich die Differenz in einer Aminosäure zwischen den Fusionsproteinen in den chromatographischen und gelelektrophoretischen Untersuchungen nicht als ein Größenunterschied abbilden lässt. Aus diesem Grund wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die zu erwartenden Fragmente nach Tryptaseverdau sind in Abbildung 16 dargestellt.



CD47-Fragmente zur Analyse

Fusionsprotein	Erwartetes Fragment
huCD47-wt-Fc	¹ pGluLLFNK ⁶
huCD47-Q1A-Fc	¹ ALLFNK ⁶

Abbildung 16: Peptidfragmente für die massenspektrometrische Analyse beider CD47-Fusionsproteine.

Zur Generierung von Peptidfragmenten wurden die CD47-Fusionsproteine für die massenspektrometrische Analyse mit Tryptase verdaut. Die zu erwartenden Fragmente des relevanten Bereichs am N-Terminus sind pGluLLFNK bzw. ALLFNK. (pGlu = Pyroglutamat, A = Alanin, L = Leucin, F = Phenylalanin, N = Asparagin, K = Lysin)

Anhand der massenspektrometrischen Analyse konnte die Existenz der zu erwartenden Fragmente bestätigt werden (Abbildung 17). Mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 705,4301 (einfach geladen) bzw. 353,2813 (zweifach geladen) wurde das N-terminale Peptidfragment ¹ALLFNK⁶ der mutierten CD47-Variante des huCD47-Q1A-Fc identifiziert (①, ⑤). Das Peptidfragment ¹pGluLLFNK⁶ des nativen CD47 beim huCD47-wt-Fc wurde mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 745,4243 (③) oder 373,2158 (⑦) vorgefunden. Zusätzlich ließen Peaks mit einem m/z -Verhältnis von 706,4141 (②) bzw. 353,7103 (⑥) und 746,4083 (④) bzw. 373,7078 (⑧) auf deaminierte Fragmente (N5 Rest der Probenfragmente) schließen, die aus der vorausgegangenen enzymatischen Deglykosylierung mittels PNGase entstanden sind.

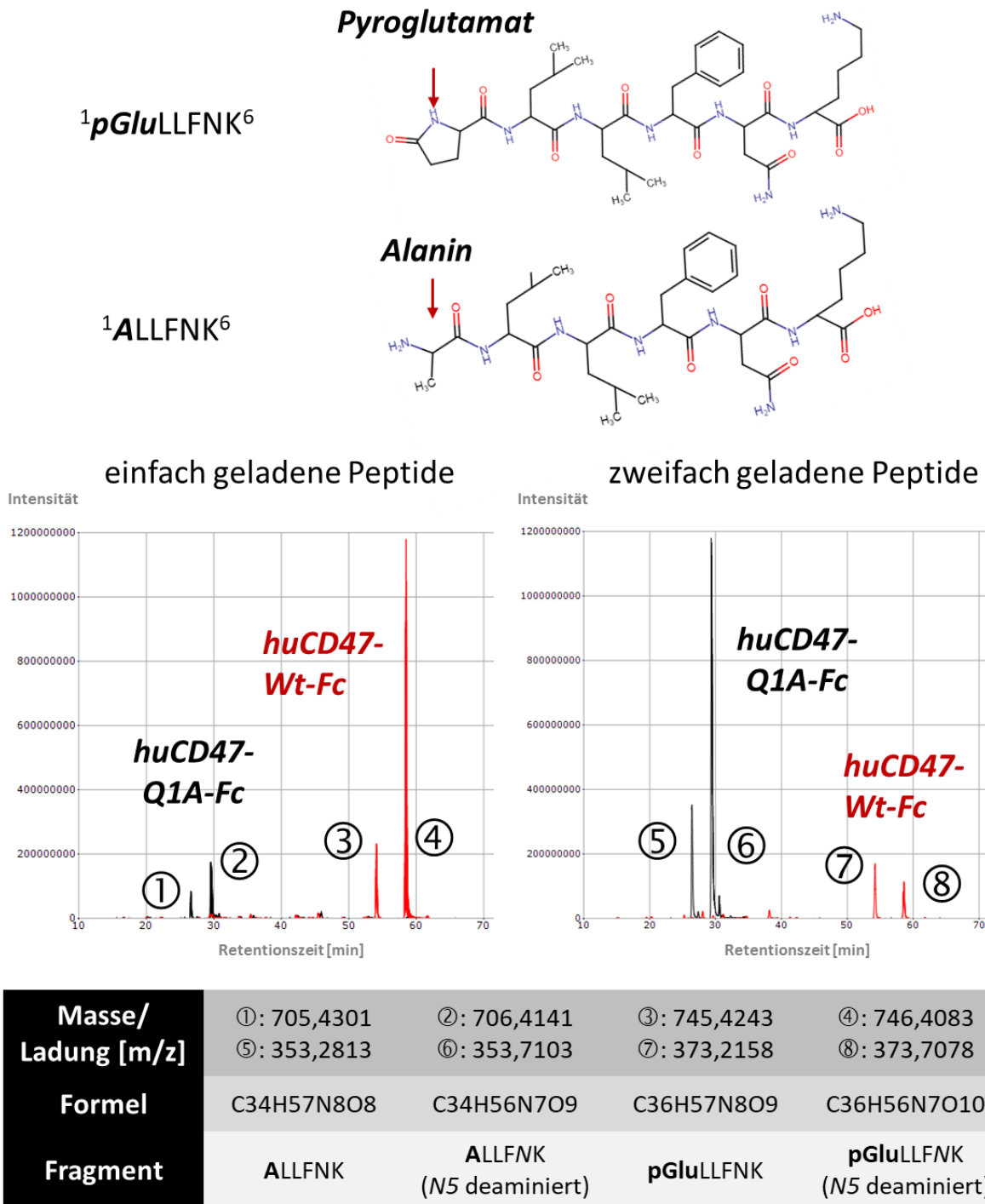


Abbildung 17: Massenspektrometrische Analyse der CD47-Fusionsproteine.

Dargestellt sind die Strukturformeln (oben) der zu erwartenden Peptidfragmente $^1\text{pGluLLFNK}^6$ (huCD47-wt-Fc) und $^1\text{ALLFNK}^6$ (huCD47-Q1A-Fc). Im unteren Teil gezeigt sind sowohl das Chromatogramm inklusive identifizierter Peaks der massenspektrometrischen Analyse als auch die Charakteristika der gefundenen Fragmente von einfach bzw. zweifach geladenen Peptiden.

3.2.1.2 Bindungsverhalten der CD47-Fusionsproteine an rekombinantes und natives SIRP α

Das Ziel der Produktion von CD47-Fusionsproteinen war die Untersuchung des Einflusses eines N-terminalen Pyroglutamats auf die Bindungsaktivität von CD47. Diese wurde sowohl mit ELISA-basierten als auch in durchflusszytometrischen Experimenten analysiert.

Im ELISA zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bindung des Fusionsproteins huCD47-wt-Fc an die Ektodomäne des rekombinanten SIRP α mit einer einsetzenden Sättigung ab 5 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{EC}_{50} = 0,36 \mu\text{g/ml}$). Im Gegensatz dazu kam es lediglich zu einer vergleichsweise sehr geringen Bindung des huCD47-Q1A-Fc, auch in höheren Konzentrationen ($\text{EC}_{50} = 5,40 \mu\text{g/ml}$) (Abbildung 18 links). Da bis auf die N-terminale Aminosäure identische Moleküle vorliegen, lässt sich die SIRP α -Bindung auf das Pyroglutamat am huCD47-wt-Fc zurückführen. Die Bindungsreaktionen bei hohen Konzentrationen des huCD47-Q1A-Fc könnten auf eine Pyroglutamat-unabhängige Bindung zurückzuführen sein.

Analog zur Bindung an SIRP α zeigte sich auch eine differenzielle Bindung der Fusionsproteine an den Pyroglutamat-abhängig bindenden CD47-Antikörper CC2C6 (Abbildung 18 Mitte). Mit einem EC_{50} -Wert von 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (huCD47-wt-Fc) scheint die Affinität von CC2C6 zu huCD47-wt-Fc höher zu sein als bei SIRP α . Weitaus geringer war dementsprechend die Bindung des huCD47-Q1A-Fc an CC2C6, auch in hohen Konzentrationen. Möglicherweise ist dieser Antikörper stärker vom Vorhandensein eines Pyroglutamats im Bindeepitop abhängig als humanes SIRP α .

Zum Nachweis des Vorliegens einer intakten CD47-Ektodomäne bei beiden Fusionsproteinen wurden zusätzlich ELISA-Experimente mit einem spezifischen CD47-Antikörper (Klon B6H12) durchgeführt (Abbildung 18 rechts). Der Antikörper bindet dabei ein distales Epitop (Pyroglutamat-unabhängig). Nahezu identische Kurvenverläufe mit EC_{50} -Werten von 0,11 $\mu\text{g/ml}$ (huCD47-wt-Fc) und 0,18 $\mu\text{g/ml}$ (huCD47-Q1A-Fc) bestätigen das Vorhandensein einer korrekt gefalteten CD47-Ektodomäne sowohl beim huCD47-wt-Fc als auch beim huCD47-Q1A-Fc.

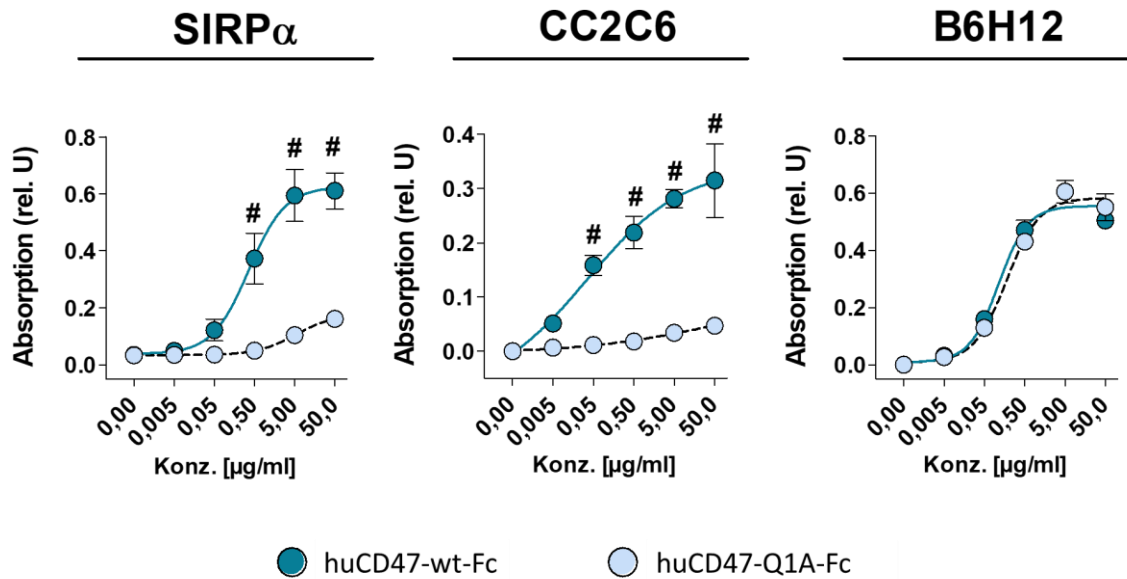


Abbildung 18: Bindungskapazitäten der CD47-Fusionsproteine im ELISA.

Dargestellt sind die Bindungen des huCD47-wt-Fc und huCD47-Q1A-Fc in unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantes SIRP α (extrazelluläre Domäne) bzw. an die CD47-Antikörper CC2C6 und B6H12. SIRP α , CC2C6 und B6H12 wurden in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt ($n=3$). Die Detektion fand über HRP-gekoppelte IgG-Fc-gerichtete Antikörper statt. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, # statistisch signifikanter Unterschied der Fusionsproteine bei angegebener Konzentration. rel. U = relative Einheit.

Nachdem die Bindung der Fusionsproteine an rekombinantes SIRP α und die CD47-Antikörper untersucht wurde, sollte die Bindung an natives SIRP α auf myeloischen Zellen analysiert werden.

Das Fusionsprotein huCD47-wt-Fc mit nativer CD47-Ektodomäne zeigte sowohl an Makrophagen (Abbildung 19 oben) als auch an Neutrophilen (Abbildung 19 unten) eine signifikant erhöhte Bindung im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu war keine Bindung des Fusionsproteins mit mutierter CD47-Ektodomäne (huCD47-Q1A-Fc) ersichtlich. Interessanterweise deuten die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitätswerte auf eine stärkere Bindung an Makrophagen als an Neutrophile. Diese Beobachtung könnte auf die höhere Expression von SIRP α auf Makrophagen zurückzuführen sein (Abbildung 12).

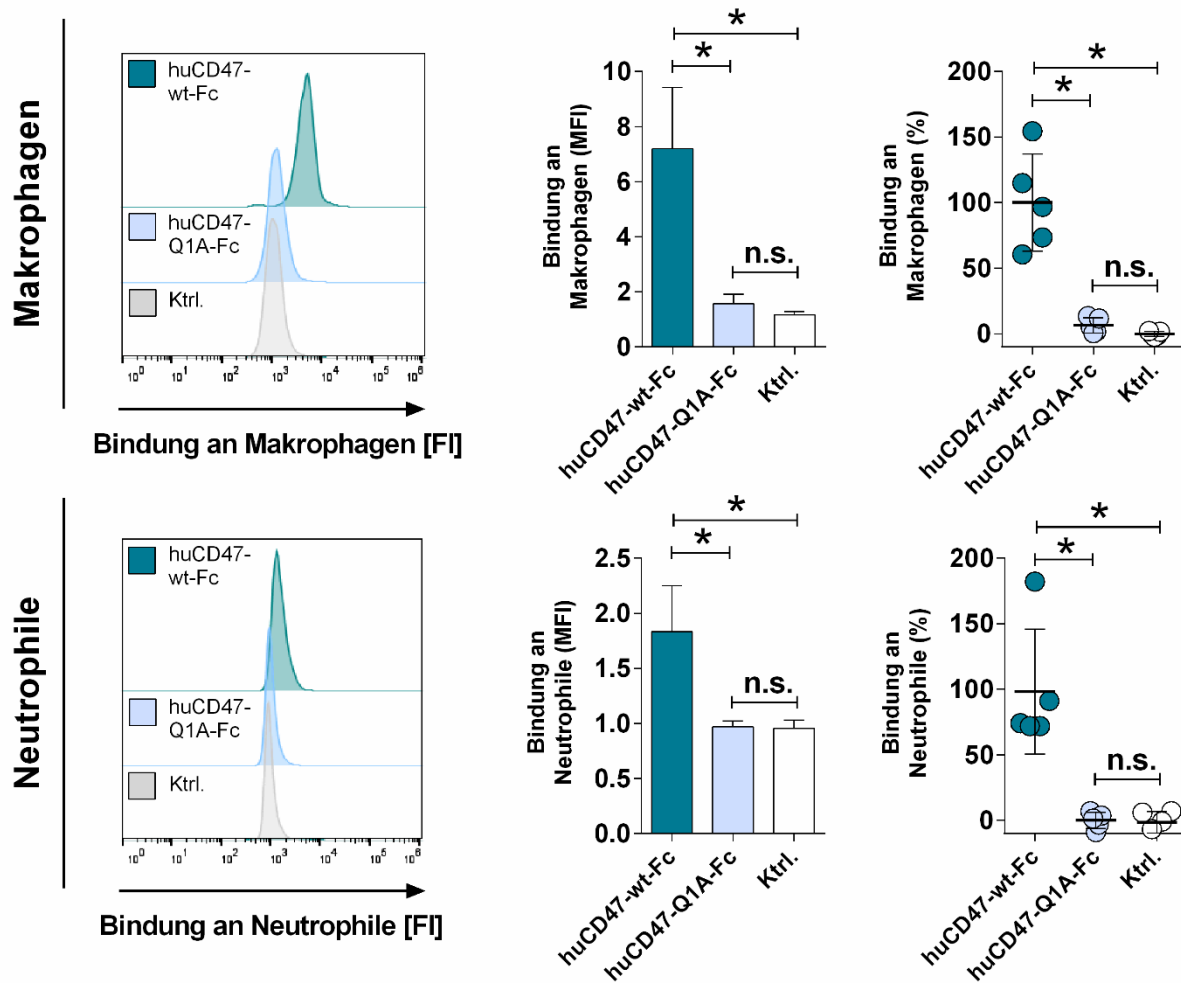


Abbildung 19: Bindung der CD47-Fusionsproteine an Makrophagen und Neutrophile.

Die Bindung der CD47-Fusionsproteine an Makrophagen bzw. Neutrophile wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Eingesetzt wurden 50 µg/ml. Die Detektion fand unter Zuhilfenahme von IgG-gerichteten FITC-konjugierten F(ab)₂-Fragmenten statt. Inkubation der Zellen nur mit Sekundäntikörper diente als Kontrolle. Exemplarisch dargestellt sind die Histogramme einer Messung (links), die mittleren Fluoreszenzintensitäten aller Messungen n=5 (Mitte) und die prozentuale Bindung n=5 (rechts) der CD47-Fusionsproteine (Bindung von huCD47-wt-Fc = 100 % Bindung). Statistik: einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied, n.s. nicht signifikant. FI = Fluoreszenzintensität, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass das Fehlen des Aminosäurederivats Pyroglutamat am N-terminalen Ende von CD47 zu einem Ausbleiben der Bindung von CD47 an SIRPα bzw. an myeloische Zellen führt. Somit wurde Pyroglutamat als essentieller Bestandteil des Bindeepitops verifiziert.

3.2.2 Pharmakologische Inhibition der Isoglutaminylylase in soliden Tumoren

Die Ausbildung des N-terminalen Pyroglutamats wird durch das im Golgi-Apparat sitzende Isoenzym der Glutaminylylase (Isoglutaminylylase, engl. *glutaminylyl-peptide cyclotransferase like*, QPCTL) katalysiert.^{195,196}

Studien zeigten bereits, dass eine Inhibition des Enzyms auf pharmakologischer Ebene zu einer Bindungsreduktion an SIRP α führte.^{195,196} Die niedermolekulare Verbindung SEN177 wurde dabei als spezifischer Inhibitor der Isoglutaminylylase verwendet. Folglich könnte eine pharmakologische Inhibition der Isoglutaminylylase einen neuartigen Therapieansatz darstellen.

Im Folgenden soll der Einsatz des QPCTL-Inhibitors SEN177 bei den soliden Tumorzelllinien A431, MDA-MB-468 und Kyse-30 unter Verwendung der gegen den EGFR zugelassenen Antikörper Cetuximab (CTX, IgG1) und Panitumumab (PANI, IgG2), als auch einer optimierten IgA2-Variante im IgA2.0-Hintergrund³⁷ von Cetuximab (CTX-IgA2) untersucht werden. Alle drei Zelllinien exprimieren sowohl den EGFR als auch CD47 (Abbildung 20).

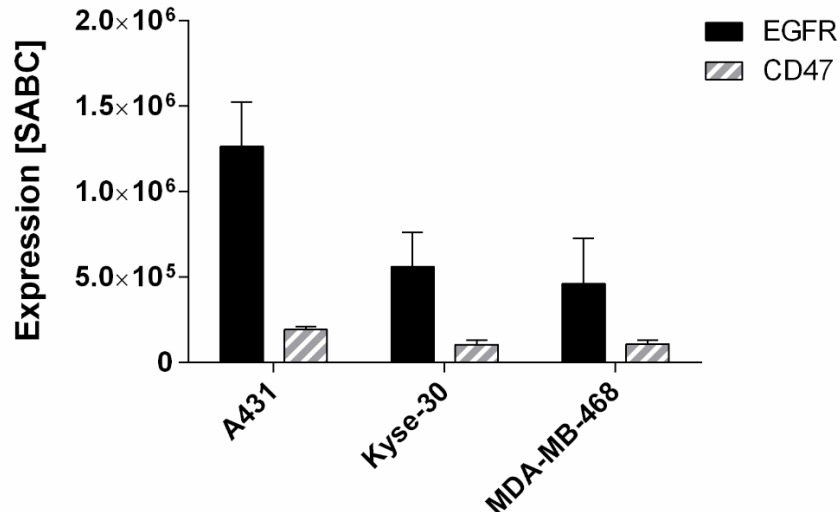


Abbildung 20: Expression von EGFR und CD47 auf soliden Tumorzelllinien.

Die Expression des EGFR und CD47 auf den Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt und die spezifischen Antigenbindungsstellen pro Zelle (specific antigen binding sites per cell, SABC) unter Verwendung des QIFIKIT[®] ermittelt. Eingesetzt wurden die Antikörper m425 (EGFR) und B6H12 (CD47) unter sättigen Bedingungen (10 μ g/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.1 Einfluss von SEN177 auf die Expression von CD47 und EGFR

Als erstes wurden MDA-MB-468-Zellen mit 10 μ M SEN177 für 72 h behandelt und die Expression von CD47 unter Einsatz des Antikörpers B6H12 durchflusszytometrisch ermittelt. Der Antikörper B6H12 bindet ein distales Epitop der CD47-Ektodomäne, so dass das N-terminale Pyroglutamat die Bindung nicht beeinflusst.^{195,196} Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Tumorzellen mit SEN177 die CD47-Expression nicht wesentlich verändert (Abbildung 21 A).

Damit therapeutische Antikörper wirken, muss ebenfalls eine ausreichende Expression der Zielantigene vorliegen. Der Verlust von Antigenen nach einer Therapie, beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern über Internalisierung, konnte unter anderem bei CD20 beobachtet werden.²³⁰ Um zu untersuchen, ob eine SEN177-Behandlung die Expression des EGFR beeinflusst, wurden die drei Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 mit dem QPCTL-Inhibitor (10 μ M) für 72 h behandelt und anschließend die Bindung von CTX durchflusszytometrisch bestimmt. Die in Abbildung 21 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei keiner Zelllinie zu einem Verlust der Antigenexpression nach SEN177-Behandlung im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen kommt. Durch die Verwendung des therapeutischen Antikörpers CTX in diesen Experimenten zeigte sich zudem, dass auch die spezifische Bindung des EGFR-gerichteten Antikörpers nicht beeinträchtigt wurde.

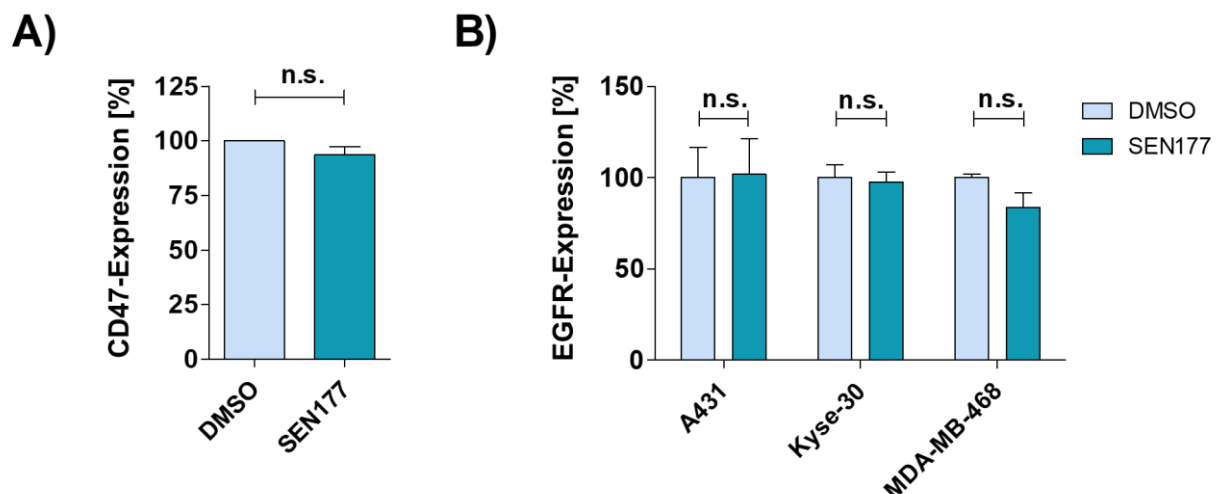


Abbildung 21: CD47- und EGFR-Expression auf soliden Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177.

Die Zellen wurden mit 10 μ M SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und danach die Antikörperbindung in der indirekten Durchflußzytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente. Die Bindung an die DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. A) Bindung des Antikörpers B6H12 (10 μ g/ml) an MDA-MB-468 Zellen. Zur Detektion dienten FITC-konjugierte anti-Maus IgG-Fc F(ab')₂-Fragmente. B) Bindung von CTX an die Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und

Abb. 21 ff.

MDA-MB-468. Die CTX-Bindung (10 µg/ml) wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-human IgG-Fc F(ab')₂-Fragmenten bestimmt. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, n.s. nicht signifikant.

3.2.2.2 Einfluss auf die CD47-SIRPα-Interaktion

An den soliden Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 wurde untersucht, ob die Hemmung der Isoglutaminylzyklase einen Einfluss auf die Bindung von CD47 an SIRPα hat. Aus eigenen Vorarbeiten im Rahmen der Masterarbeit ging hervor, dass eine Konzentration von 10 µM SEN177 über einen Zeitraum von 72 h die maximale Bindungsreduktion eines rekombinanten SIRPα-Fusionsproteins an die soliden Tumorzelllinien herbeiführt (Anhang: Abbildung 48), so dass dieses Behandlungsschema als Grundlage der Experimente diene. Das Fusionsprotein besteht aus der Ektodomäne des SIRPα und einem mutierten Fc-Teil eines IgG2 ohne Fc-Rezeptorbindung (SIRPα-Fc) und ist eine modifizierte Variante, die eine stärkere Affinität als das native SIRPα besitzt.²²⁶ Eingesetzt wurde das SIRPα-Fc in einer sättigenden Konzentration von 5 µg/ml, die zuvor an der Zelllinie A431 ermittelt wurde (Anhang: Abbildung 49). Auch höhere Konzentrationen an SIRPα-Fc konnten die QPCTL-Inhibition nicht überwinden (Abbildung 49).

In Abbildung 22 ist ersichtlich, dass eine signifikante Reduktion der SIRPα-Fc-Bindung nach SEN177-Behandlung bei allen untersuchten Tumorzelllinien vorliegt. Die Bindungsreduktion im Vergleich zu DMSO behandelten Kontrollzellen belief sich bei A431 auf $36,2 \pm 10,0$ %, bei Kyse-30 betrug sie $56,9 \pm 7,5$ % und bei der MDA-MB-468 war eine Reduktion von $56,9 \pm 8,3$ % vorhanden. Die Daten lassen darauf schließen, dass SEN177 sich für eine effektive und konsistente Inhibition der QPCTL in unterschiedlichen Tumorzellen eignet.

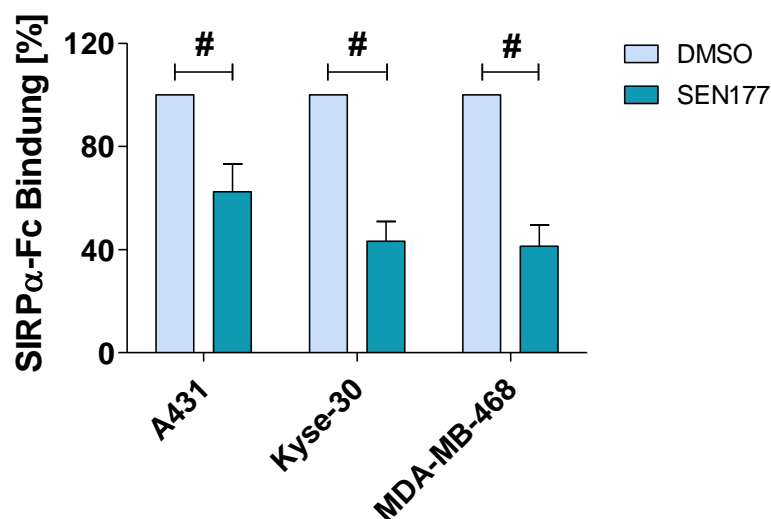


Abbildung 22: Reduktion der SIRP α -Fc Bindung auf soliden Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177. Die Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 wurden für 72 h mit 10 μ M SEN177 oder DMSO behandelt und anschließend die Bindung des SIRP α -Fc (5 μ g/ml) durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Detektion dienten PE-konjugierte anti-human IgG-Fc F(ab')₂-Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die Bindung wurde auf die DMSO-Kontrolle normiert. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, # statistisch signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle.

3.2.2.3 Einfluss auf die Zellvitalität und direkte Antikörpereffekte

EGFR-bindende therapeutische Antikörper wie CTX sind in der Lage über unterschiedliche Mechanismen Tumorzellen zu eliminieren. Beispielsweise ermöglicht CTX die Induktion einer direkten Zellwachstumsinhibition.²³¹ Um zu überprüfen, ob SEN177 per se die Zellvitalität beeinträchtigt bzw. die Induktion von direkten Antikörpereffekten verändert, wurden Proliferationstests mit den drei Zelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 durchgeführt und die kolorektale Karzinomzelllinie DiFi zur Ermittlung der direkten Effekte eingesetzt.

Eine Behandlung der Zelllinien mit steigender SEN177-Konzentration führte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einem beeinträchtigten Zellwachstum (Abbildung 23). In einem Bereich bis 50 μ M wirkt SEN177 somit nicht toxisch auf die eingesetzten humanen Tumorzellen.

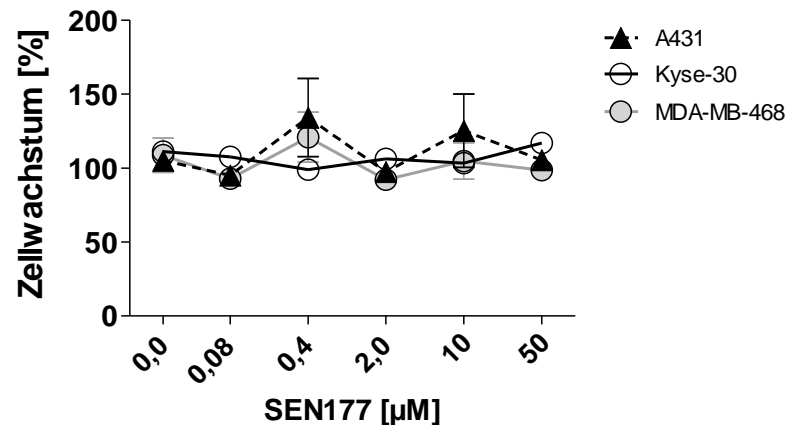


Abbildung 23: Zellwachstum von EGFR-positiven Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177. Die Tumorzelllinien A431, Kyse-30 und MDA-MB-468 wurden mit DMSO oder unterschiedlichen Konzentrationen an SEN177 für 72 h behandelt und anschließend die Zellvitalität in einem kolorimetrischen MTS-basierten Test nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des prozentualen Zellwachstums (DMSO-Kontrolle/0 μ M SEN177 = 100 %) von drei unabhängigen Experimenten.

Bei DiFi-Zellen führt der EGFR-gerichtete Antikörper CTX zu einer konzentrationsabhängigen Wachstumsinhibition (Abbildung 24). Der direkte Effekt des Antikörpers blieb nach SEN177-Behandlung unverändert (Abbildung 24). Die halbmaximalen inhibierenden Konzentrationen liegen mit 0,055 μ g/ml ($IC_{50_{DMSO}}$) und 0,062 μ g/ml ($IC_{50_{SEN177}}$) nah beieinander. Somit bewirkt der QPCTL-Inhibitor SEN177 in Kombination mit CTX weder eine Beeinträchtigung noch eine Förderung des Tumorzellwachstums.

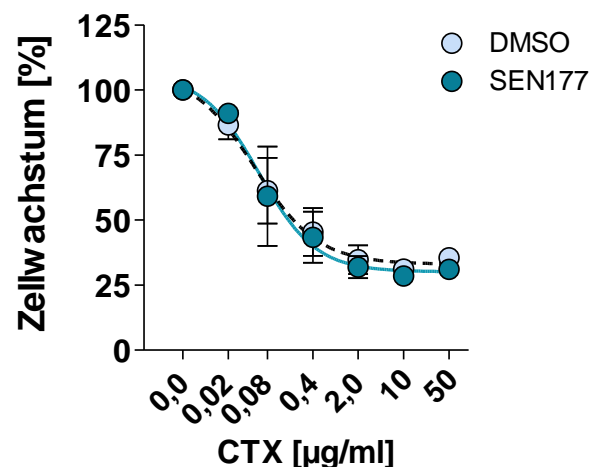


Abbildung 24: Ermittlung der direkten Effekte von CTX auf das Wachstum von DiFi-Zellen ohne und nach Behandlung mit SEN177.

DiFi-Zellen wurden mit 10 μ M SEN177 oder DMSO zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen an CTX für 72 h behandelt. Das Zellwachstum wurde anschließend im MTS-Test bestimmt (DMSO-Kontrolle+ 0 μ g/ml CTX = 100 % Zellwachstum). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.2.4 Einfluss auf die antikörperabhängige komplement- und zellvermittelte Tumorzelleliminierung

Die indirekten Effekte von Antikörpern spielen eine wichtige Rolle in der antikörperbasierten Tumorummuntherapie. Der in der Klinik eingesetzte EGFR-gerichtete Antikörper CTX ist beispielsweise in der Lage das Komplementsystem im Zusammenspiel mit einem weiteren EGFR-gerichteten Antikörper zu aktivieren (CDC) oder zellvermittelte Zytotoxizitäten (ADCC) zu induzieren.¹⁰¹

Die Isoglutaminylylase katalysiert die Ausbildung des Pyroglutamats unterschiedlicher Proteinsubstrate²⁰⁰, so dass möglicherweise diverse Effektorfunktionen beeinflusst sind. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Behandlung von Tumorzellen mit SEN177 einen Einfluss hat auf die CDC oder ADCC, vermittelt durch mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) bzw. isolierte NK-Zellen.

Als Zielzellen wurden A431-Zellen benutzt, die mit dem QPCTL-Inhibitor SEN177 behandelt wurden. Die Antikörper wurden unter sättigenden Bedingungen (10 µg/ml) eingesetzt. Bindungstitrationen des Cetuximab und Matuzumab (MTZ) auf A431 zeigten, dass ab 10 µg/ml eine Absättigung des EGFR eintritt (Anhang: Abbildung 50). Im CDC wurde eine antikörpervermittelte Aktivierung des Komplementsystems lediglich unter Einsatz einer Kombination der Antikörper CTX und MTZ beobachtet (Abbildung 25 A). Dabei lag kein Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und den SEN177-behandelten Zellen vor. Im Gegensatz dazu ist CTX alleine in der Lage PBMC bzw. isolierte NK-Zellen zu aktivieren und eine spezifische Tumorzelllyse zu induzieren (Abbildung 25 B, C). Ähnlich wie bei der CDC unterscheidet sich diese nicht zwischen den DMSO- und SEN177-behandelten Zellen.

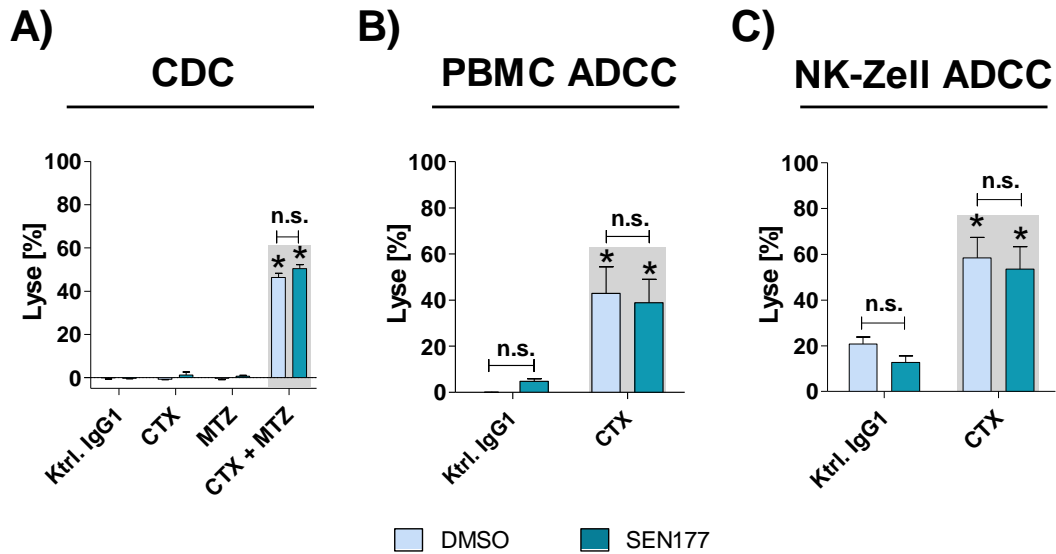


Abbildung 25: 51 Chromfreisetzungstests mit Cetuximab bei SEN177-behandelten A431-Zellen.

A431 Zellen wurden mit 10 μ M SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und fungierten als Zielzellen in 51 Chromfreisetzungstests. Als Effektoren dienten (A) humanes Serum (25 % v/v, CDC), (B) isolierte mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (E:T = 40:1, PBMC ADCC) oder (C) aus peripherem Blut isolierte NK-Zellen (E:T = 10:1, NK-Zell ADCC). Die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper beliefen sich auf 10 μ g/ml (Ktrl. IgG1 = Rituximab). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (NK-Zell & PBMC ADCC) bzw. sieben (CDC) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, n.s. nicht signifikant.

Da Monozyten als myeloische Zellen in der PBMC-Fraktion vorliegen und SIRP α exprimieren²⁰³, wäre ein Anstieg der Tumorzelllyse nach SEN177-Behandlung in PBMC ADCC-Versuchen denkbar gewesen. Möglicherweise ist die prozentuale Anzahl der Monozyten in der PBMC-Fraktion mit 10-20 %²³² zu gering, um einen solchen Effekt zu erkennen und die generierte Lyse wurde durch die sich in der PBMC-Fraktion befindlichen NK-Zellen verursacht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Inhibition der QPCTL keine Effekte auf nicht-myeloische Effektoren (Komplementsystem, NK-Zellen) hat.

Im nächsten Schritt sollten nun myeloische Zellen in Form von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen herangezogen werden.

Für die Phagozytose wurden Makrophagen (M0-Typus) durch Adhärenz von Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender unter Zugabe von M-CSF generiert. Antikörper wurden unter sättigenden Bedingungen (50 μ g/ml) eingesetzt, wobei aus Bindungstiterationen hervorging, dass der sättigende Bereich ab einer Konzentration von 10 μ g/ml (CTX, PANI, CTX-IgA2) einsetzt (Anhang: Abbildung 51 exemplarisch auf MDA-MB-468).

Die Phagozytose von Kyse-30- und MDA-MB-468-Zellen wurde mikroskopisch ermittelt (manuelle Auszählung) und als phagozytischer Index (PI) angegeben. A431-Zellen ließen sich nicht phagozytieren. Möglicherweise sind hier unterschiedliche Zellcharakteristika, wie die im Vergleich zu MDA-MB-468- und Kyse-30-Zellen erhöhte Zellgröße, wichtige Faktoren, die die Phagozytose beeinflussen.²³³

Die Phagozytose der Tumorzelllinien MDA-MB-468 und Kyse-30 konnte nach Behandlung der Zellen mit SEN177 unter Verwendung aller Antikörper im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen signifikant gesteigert werden (Abbildung 26). Die stärkste Phagozytose wurde durch den IgG2-Antikörper Panitumumab sowohl bei den MDA-MB-468- ($PI = 73,23 \pm 5,49$ vs. $34,00 \pm 5,03$ bei Kontrollzellen) als auch den Kyse-30-Zellen ($PI = 59,23 \pm 20,89$ vs. $27,25 \pm 6,34$) induziert. Cetuximab als IgG1 führte mit PI-Werten von $60,23 \pm 8,78$ bei MDA-MB-468 ($PI = 26,67 \pm 7,06$ bei Kontrollzellen) bzw. $51,25 \pm 11,86$ bei Kyse-30 ($PI = 28,00 \pm 5,48$ bei Kontrollzellen) zur zweitstärksten Tumorzellphagozytose. Eine QPCTL-Inhibition konnte auch die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose durch die IgA2-Variante des Cetuximab (CTX-IgA2) steigern. Die phagozytischen Indizes beliefen sich hierbei auf $57,00 \pm 8,96$ (MDA-MB-468) und $33,75 \pm 3,71$ (Kyse-30), wobei ohne QPCTL-Inhibition phagozytische Indizes von lediglich $22,90 \pm 5,23$ (MDA-MB-468) und $19,70 \pm 3,30$ ermittelt wurden.

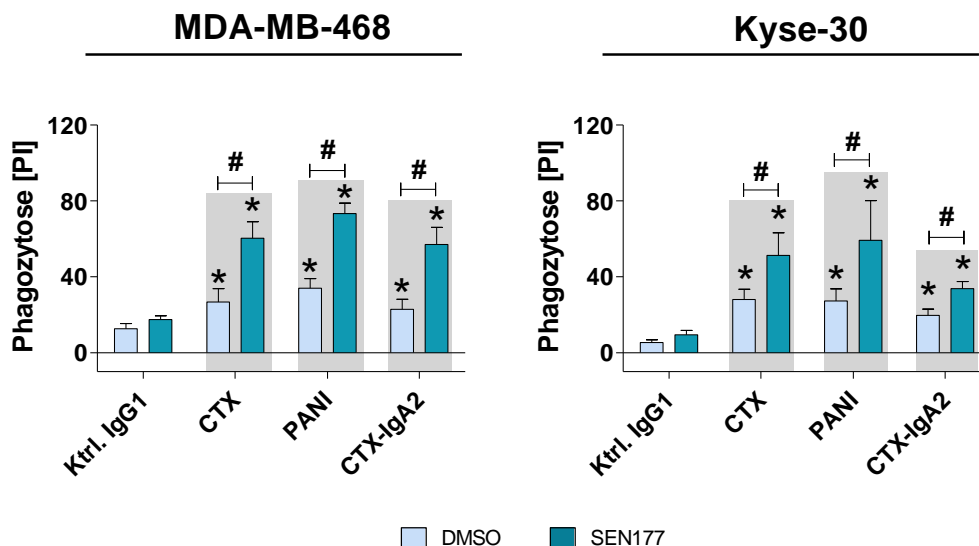


Abbildung 26: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von EGFR-positiven Zellen ohne und mit SEN177-Behandlung.

Die Zelllinien MDA-MB-468 und Kyse-30 wurden mit $10 \mu\text{M}$ SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und fungierten als Zielzellen. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) dienten als Effektoren (E:T = 1:2). Alle Antikörper wurden mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt (Ktrl. IgG1 = Rituximab). Nach zweistündiger Co-Kultur wurde die Phagozytose mikroskopisch ermittelt und der phagozytische Index (PI) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (MDA-MB-468) bzw. vier (Kyse-30) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-

Abb. 26 ff.

Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikanter Unterschied zwischen DMSO- und SEN177-behandelten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Makrophagen-vermittelte Phagozytose von EGFR-positiven Tumorzellen in Gegenwart von therapeutischen Antikörpern *in vitro* durch eine pharmakologische Inhibition der QPCTL in Tumorzellen verstärkt werden kann.

Da Neutrophile neben den Makrophagen ebenfalls SIRP α exprimieren, könnten auch diese Effektoren von einer Inhibition der QPCTL in Tumorzellen und einer damit einhergehenden Blockade der SIRP α -CD47-Interaktion profitieren. Um dies in ADCC-Experimenten zu untersuchen, wurden die EGFR-positiven Tumorzelllinien A431, MDA-MB-468 und Kyse-30 für 72 h mit SEN177 (10 μ M) oder DMSO behandelt und als Zielzellen eingesetzt. Die Zugabe von GM-CSF während der Experimente diente der zusätzlichen Aktivierung der Neutrophilen. Nach Titration der Antikörper in ADCC-Versuchen, exemplarisch mit der Zelllinie MDA-MB-468 (Anhang: Abbildung 52), wurden die Antikörper unter sättigenden Bedingungen mit einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt.

Vergleichbar mit den vorangegangenen ADCP-Versuchen konnte die Tumorzelllyse durch den IgG2-Antikörper PANI auf allen untersuchten Zelllinien durch eine QPCTL-Inhibition signifikant verbessert werden (Abbildung 27). Für A431 betrugen die Lyseraten $35,85 \pm 6,56$ % (vs. $21,43 \pm 1,82$ % DMSO-Kontrolle), für MDA-MB-468 waren sie $62,25 \pm 14,17$ % (vs. $41,75 \pm 13,16$ % DMSO-Kontrolle) und bei Kyse-30 betrugen sie $33,76 \pm 8,87$ % (vs. $21,64 \pm 7,54$ % DMSO-Kontrolle). Ein signifikanter Anstieg der Tumorzelllyse nach SEN177-Behandlung konnte auch mit dem CTX-IgA2 bei den Zelllinien MDA-MB-468 und Kyse-30 beobachtet werden. Die Lyseraten lagen bei $67,93 \pm 10,92$ % (vs. $41,31 \pm 11,04$ % DMSO-Kontrolle) für MDA-MB-468 und $52,30 \pm 3,58$ % (vs. $38,91 \pm 8,86$ % DMSO-Kontrolle) für Kyse-30. Die Lyse der A431-Zellen belief sich auf $61,58 \pm 6,93$ % (SEN177) und war bereits bei den Kontrollzellen mit $58,45 \pm 5,57$ % (DMSO) relativ hoch. Im Vergleich induzierte der IgG1 (CTX) die geringste Tumorzelllyse, wobei kein signifikanter Einfluss der QPCTL-Inhibition zu vermerken war. Die Lyseraten betrugen $28,45 \pm 1,19$ % (SEN177) und $21,90 \pm 5,29$ % (DMSO) bei A431, bei MDA-MB-468 waren sie $26,25 \pm 8,19$ % (SEN177) und $17,25 \pm 8,34$ % (DMSO) und bei Kyse-30 betrugen die Lyseraten $6,57 \pm 2,54$ % (SEN177) bzw. $3,24 \pm 2,04$ % (DMSO).

Die Aktivierung der Neutrophilen nach QPCTL-Inhibition über PANI oder CTX-IgA2 ist im Vergleich zu CTX-IgG1 signifikant höher (indiziert durch §).

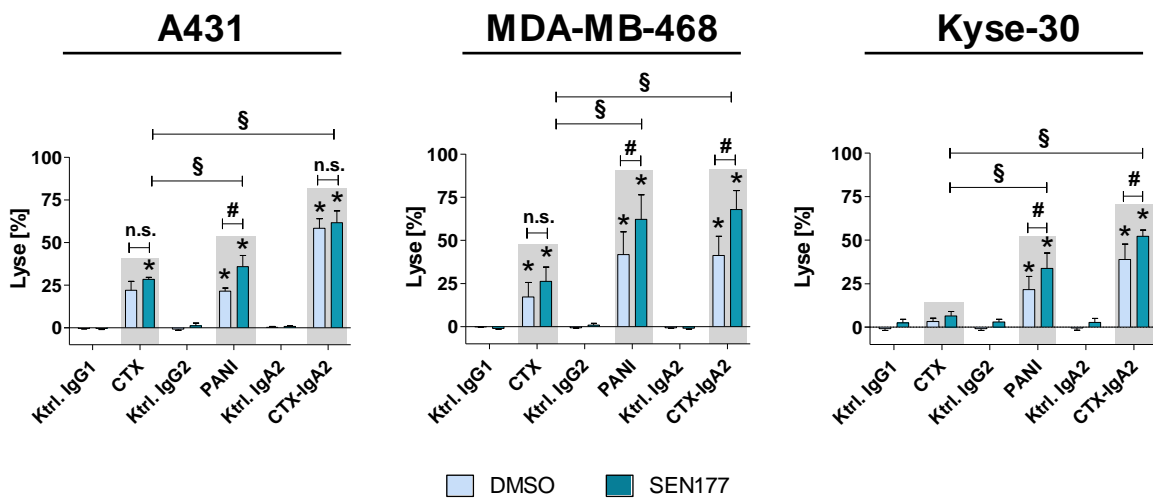


Abbildung 27: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber EGFR-positive Tumorzellen ohne und nach SEN177-Behandlung.

A431-, MDA-MB-468- und Kyse-30-Zellen wurden mit 10 μ M SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und dienten als Zielzellen in 51 Chromfreisetzungstests. Aus dem peripheren Blut isolierte Neutrophile fungierten als Effektorzellen (E:T = 40:1 [A431, Kyse-30] und 80:1 [MDA-MB-468]). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt. Die Kontrollantikörper sind Varianten auf der Basis von Rituximab. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (A431, Kyse-30) bzw. vier (MDA-MB-468) unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Spendern. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikanter Unterschied zwischen DMSO- und SEN177-behandelten Zellen, § statistisch signifikanter Unterschied zwischen CTX und PANI bzw. CTX und CTX-IgA2 (SEN177-behandelte Zellen).

Die Neutrophilen-vermittelte Tumorzelllyse von EGFR-positiven Tumorzellen kann folglich über eine Inhibition der QPCTL, insbesondere unter Verwendung von PANI oder CTX-IgA2, *in vitro* gesteigert werden.

3.2.2.5 Tumorzelleliminierung *in vivo*

Von essentieller Bedeutung ist die Frage, ob eine QPCTL-Inhibition einen Effekt auf die Tumorzelleliminierung *in vivo* hat. Da Mäuse keinen Rezeptor besitzen, der humane IgA-Moleküle bindet, wurden für die Ermittlung der IgA2-induzierten Effekte huCD89 transgene SCID-Mäuse²²⁹ eingesetzt. Es wurden MDA-MB-468-Zellen mit SEN177 (10 μ M, 72 h) oder DMSO vorbehandelt, mit einem Fluorophor markiert und in nicht-transgene (nTg) oder für das huCD89 transgene (CD89 Tg) SCID-Mäuse zusammen mit murinen Ba/F3-Zellen im Verhältnis von 5:1 intraperitoneal injiziert.

Anschließend wurden den Mäusen jeweils 100 µg der EGFR-gerichteten Antikörper CTX, PANI (in nicht-transgenen SCID Mäusen) und CTX-IgA2 (in huCD89 transgenen SCID-Mäusen) als Einmaldosis appliziert. Nach 16 Stunden wurden die Tiere euthanasiert und die injizierten Zellen aus der Bauchhöhle isoliert. Das Verhältnis der humanen Tumorzellen zu den murinen Ba/F3 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Da die murinen Ba/F3-Zellen als syngene Zellen nicht eliminiert werden, gibt ein verändertes/reduziertes Verhältnis der MDA-MB-468-Zellen zu den Ba/F3-Zellen Aufschluss auf die Tumorzelleliminierung *in vivo*.

Da SEN177 eine Toxizität in Mäusen aufweist (Gefahrenbezeichnung GHS06), wurden die Tumorzellen mit dem QPCTL-Inhibitor *in vitro* vorbehandelt und der Inhibitor vor Injektion der Tumorzellen herausgewaschen. Demzufolge sollte zunächst die Persistenz der QPCTL-Inhibition nach dem Waschen analysiert werden. Gemessen wurde die Bindung von rekombinantem SIRP α -Fc an die behandelten Tumorzellen im zeitlichen Verlauf (Abbildung 28). Aus den Versuchen ging hervor, dass nach 24 h eine signifikante Bindungsreduktion des SIRP α -Fc von 63 % (Restbindung 37 %) im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen vorlag. Die anfängliche Bindungsreduktion zum Zeitpunkt Null lag bei 81 % (Restbindung 19 %). Nach 96 h ließ sich nur noch eine Reduktion von 20 % verzeichnen (Abbildung 28). Eine verbleibende signifikante Inhibition der Pyroglutamatbildung war folglich für Kurzzeitversuche über 16 h gewährleistet.

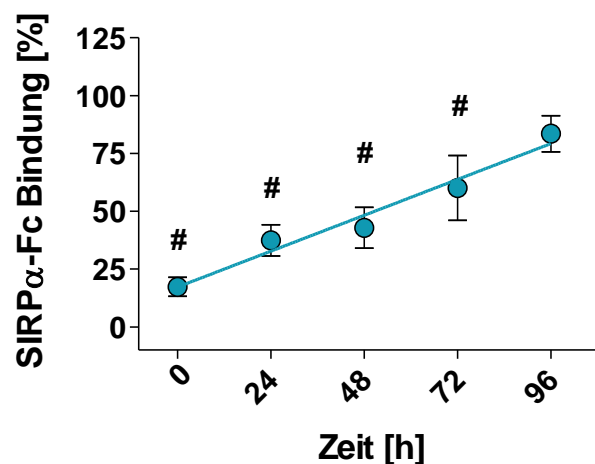


Abbildung 28: Zeitabhängige Wiederherstellung der SIRP α -Fc Bindung nach SEN177 Behandlung. MDA-MB-468-Zellen wurden mit 10 µM SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und anschließend der Inhibitor ausgewaschen. Nach einer weiteren Kultivierung von 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h wurde die Bindung von SIRP α -Fc (5 µg/ml) an die Zellen mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Als Sekundärantikörper fungierten PE-konjugierte anti-human IgG F(ab')₂-Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, # statistisch signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (100 %).

Die SEN177-Behandlung von Tumorzellen auf die antikörperabhängige Tumorzelleliminierung in den Mäusen hatte eine im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikante Reduktion der Tumorzellbelastung zur Folge. Dies war bei allen eingesetzten EGFR-Antikörpern der Fall (Abbildung 29). In Hinblick auf die QPCTL-Inhibition zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Tumorzelleliminierung der SEN177-behandelten Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen. Statistisch signifikante Unterschiede waren hier jedoch nicht erkennbar. Möglicherweise lag dies an den geringen Gruppengrößen (fünf Tiere pro Behandlungsgruppe).

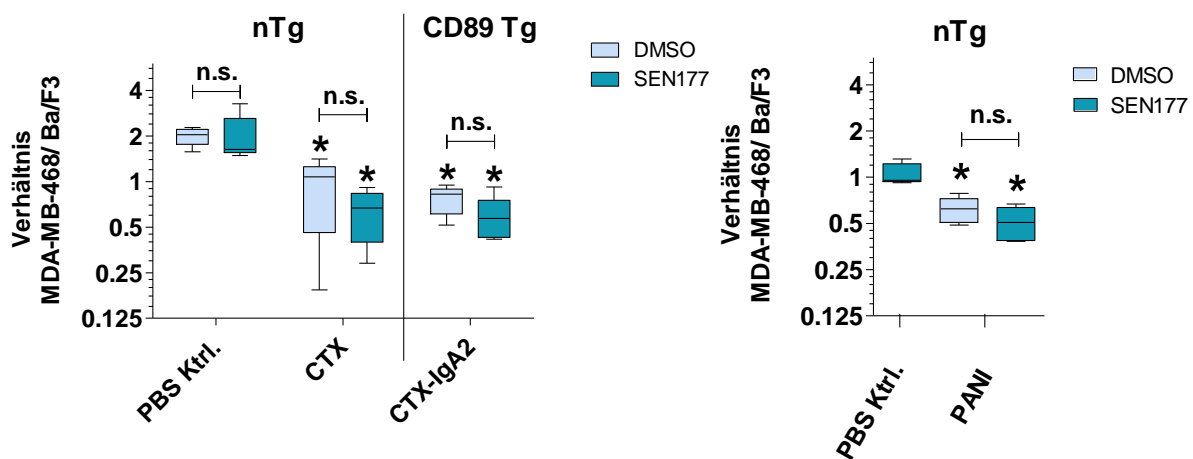


Abbildung 29: Antikörpervermittelte Eliminierung von humanen MDA-MB-468-Zellen im xenogenen Mausmodell. MDA-MB-468-Zellen wurden mit 10 μ M SEN177 oder DMSO für 72 h behandelt und anschließend intraperitoneal zusammen mit murinen Ba/F3-Zellen im Verhältnis 5:1 in SCID-Mäuse injiziert. Die Tiere wurden nach Inokulation der Zellen mit 100 μ g Antikörper oder PBS als Kontrolle behandelt (CTX und PANI in nicht transgene SCID-Mäuse, CTX-IgA2 in huCD89 Tg SCID-Mäuse). Nach 16 h wurden die Mäuse euthanasiert und die Anzahl der inokulierten Zellen aus der peritonealen Flüssigkeit durchflusszytometrisch bestimmt. Aufgetragen ist das mediane Verhältnis der MDA-MB-468- zu den Ba/F3-Zellen von jeweils fünf Tieren pro Gruppe. Statistik: zweiseitiger t-Test (ungepaart), * statistisch signifikante Unterschiede zur PBS-Kontrolle, n.s. nicht signifikant.

Zur Visualisierung des Effekts einer größeren Versuchstierpopulation wurden folglich alle Einzeltiere zusammengefasst (Abbildung 30). Hierbei wird ersichtlich, dass eine QPCTL-Behandlung ohne Verwendung von spezifischen Antikörpern (Abbildung 30, links) nicht zu einer Tumorzelleliminierung führte. Erst die Kombination mit den EGFR-Antikörpern resultierte in einer signifikant reduzierten Tumorzelllast verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abbildung 30, rechts).

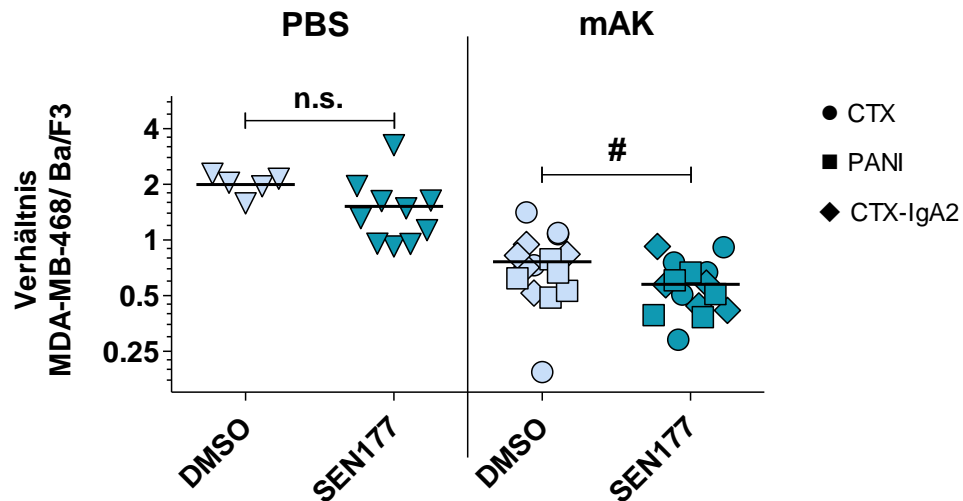


Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Tumorzellbelastung aller mit PBS oder antikörperbehandelten Einzeltiere. Die Gruppengröße für PBS/DMSO beträgt $n=5$, für PBS/SEN177 $n=10$ und für antikörperbehandelte Tiere (DMSO bzw. SEN177) jeweils $n=15$ Mäuse. Statistik: zweiseitiger t-Test (ungepaart), # statistisch signifikanter Unterschied zwischen DMSO und SEN177, n.s. nicht signifikant, mAK = monoklonaler Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine QPCTL-Inhibition in der antikörperbasierten Tumorzelleliminierung sowohl *in vitro*, mit Makrophagen und Neutrophilen als Effektorzellen, als auch *in vivo* verstärkte antitumorale Effekte erzielte. Eine pharmakologische Inhibition der Isoglutaminylyklase könnte somit eine interessante Option für die Blockade der SIRP α -CD47-Achse darstellen.

Eine weitere Alternative ist die biologische Blockade der SIRP α -CD47-Achse, die im nächsten Abschnitt genauer untersucht wird.

3.3 Biologische Blockade der CD47-SIRPa-Achse

Die Kombination aus einer antikörperbasierten Tumormimmuntherapie mit einer myeloischen Checkpoint-Blockade ist eine potenzielle und bereits in der Klinik getestete Option.²¹⁷

Im Modellsystem der T-ALL sollte die Tumorzelleliminierung durch myeloische Zellen mit dem monoklonalen CD38-Antikörper Daratumumab in Kombination mit einer CD47-Blockade untersucht werden. Als Zielzellen fungierten hierbei die T-ALL-Zelllinien HSB-2, MOLT-13, P12-ICHIKAWA, die sowohl CD38 als auch CD47 exprimieren (Abbildung 31). Als therapeutische Antikörper wurde der für das Multiple Myelom zugelassene monoklonale Antikörper Daratumumab (DARA) als auch eine IgA2-Variante im IgA2.0-Hintergrund (DARA-IgA2) eingesetzt.

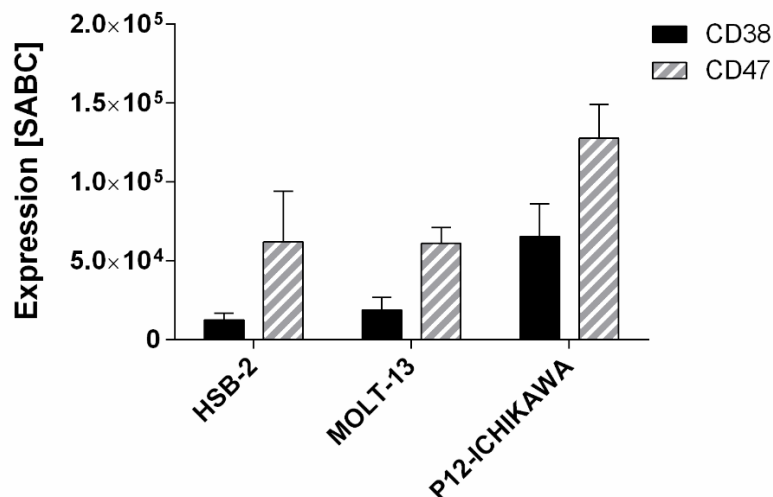


Abbildung 31: CD38- und CD47-Expression auf T-ALL-Tumorzelllinien.

Die CD38- und CD47-Expression auf den Tumorzelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt und die spezifischen Antigenbindungsstellen pro Zelle (specific antigen binding sites per cell, SABC) unter Verwendung des QIFIKIT[®] ermittelt. Eingesetzt wurden die Antikörper HB-7 (CD38) und B6H12 (CD47) unter sättigenden Bedingungen (10 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.1 Eliminierung von T-ALL-Zellen durch myeloische Effektorzellen mit CD38-gerichteten Antikörpern

Zur Therapie der T-ALL ist bis dato in Europa und den USA noch keine antikörperbasierte Immuntherapie zugelassen, jedoch liegen mögliche Zielstrukturen (u. a. CD38) vor.²³⁴ Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob der CD38-gerichtete Antikörper Daratumumab als IgG1 bzw. IgA2 zu einer Tumorzellphagozytose bzw. Lyse durch myeloische Zellen (Makrophagen und Neutrophile) führt. Die Produktion und initiale Charakterisierung

des DARA-IgA2 sind Bestandteile einer weiteren aktuellen Promotionsarbeit und werden deshalb hier nicht weiter aufgegriffen.

Im Laufe der vorliegenden Dissertation wurde die manuelle, mikroskopische Auszählung der Makrophagen-vermittelten Phagozytose durch ein automatisiertes Verfahren auf Basis der Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie substituiert. Dadurch war eine zeitabhängige Bestimmung der Phagozytose möglich. Abbildung 32 zeigt Fluoreszenzaufnahmen der zeitabhängigen Phagozytose von MOLT-13-Zellen nach Einsatz des spezifischen Antikörpers DARA-IgA2 oder einer Isotypkontrolle. Durch das saure Milieu im Phagolysosom kommt es zum Intensitätsanstieg des tumorzellgebundenen, pH-sensitiven Fluorophors. Gemessen wurde die Phagozytose anhand der rot-fluoreszierenden Objekte pro Bild (ROI, *red objects per image*). Für eine optimale Visualisierung wurden die phagozytierten Tumorzellen in Abbildung 32 in grün anstatt rot dargestellt.

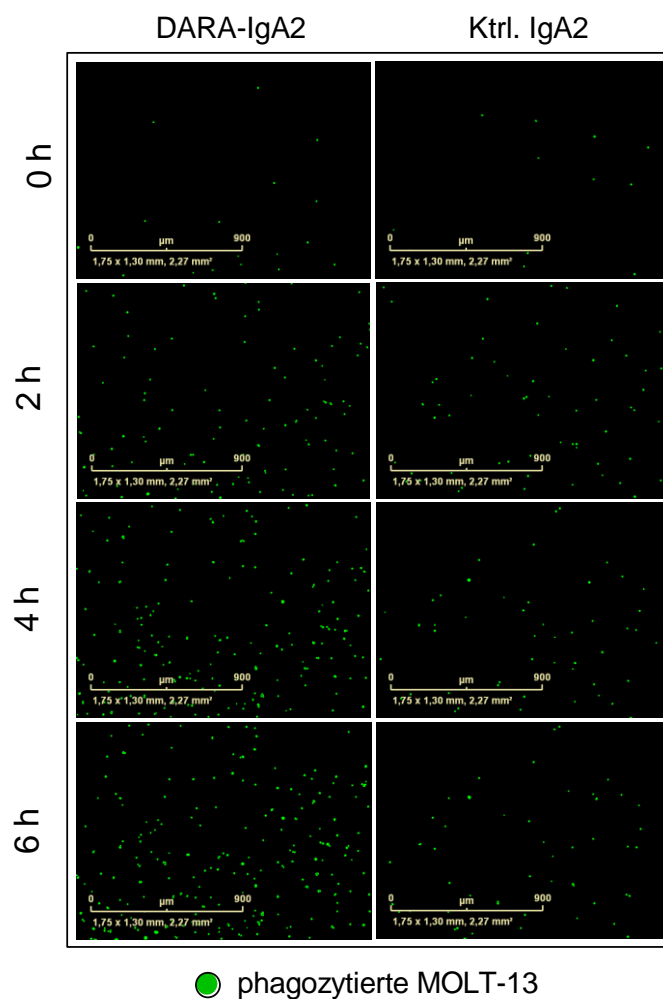


Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen der antikörperabhängigen Makrophagen-vermittelten Phagozytose von MOLT-13-Zellen im zeitlichen Verlauf.

Abb. 32 ff.

MOLT-13-Zellen wurden mit dem pH-sensitiven Fluorophor pHrodo markiert (0,5 µg/ml) und als Zielzellen eingesetzt. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) dienten als Effektoren (E:T = 1:1). Der CD38-gerichtete Antikörper DARA-IgA2 als auch der Kontrollantikörper (CTX-IgA2) wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die zeitabhängige Phagozytose wurde mittels automatisierter Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie über das IncuCyte-System analysiert. Dargestellt sind Beispielfluoreszenzaufnahmen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, in denen in Grün die phagozytierten MOLT-13-Zellen gezeigt sind.

In den ADCP-Versuchen wurden die Antikörper unter sättigenden Bedingungen eingesetzt (10 µg/ml). Aus Bindungstitrationen der Daratumumab-Varianten an MOLT-13-Zellen ging hervor, dass der IgG1 und der IgA2 gleiche Bindungskapazitäten aufweisen und eine Ab-sättigung von CD38 ab einer Konzentration von 2 µg/ml eintritt (Anhang: Abbildung 53).

Für die HSB-2-Zellen konnte weder mit Daratumumab als IgG1 noch als IgA2 eine spezifische Phagozytose über M0-Makrophagen verzeichnet werden (Abbildung 33, links). Im Gegensatz dazu induzierten DARA und DARA-IgA2 die Phagozytose von MOLT-13-Zellen, wobei hier die IgA2-Variante signifikant besser als die IgG1-Variante war (maximale ROI bei 4 h: 860,15 ± 284,53 bei DARA-IgA2 vs. 325,56 ± 25,53 bei DARA; Abbildung 33, Mitte). Die P12-ICHIKAWA-Zellen wurden am effektivsten unter Einsatz des DARA als IgG1 phagozytiert (maximale ROI bei 4h: 347,78 ± 11,35; Abbildung 33, rechts). Obwohl signifikante Unterschiede zu DARA-IgA2 (maximale ROI bei 4h: 189,94 ± 16,42) ersichtlich waren, lag insgesamt eine geringe Phagozytose im Vergleich zu den MOLT-13-Zellen vor.

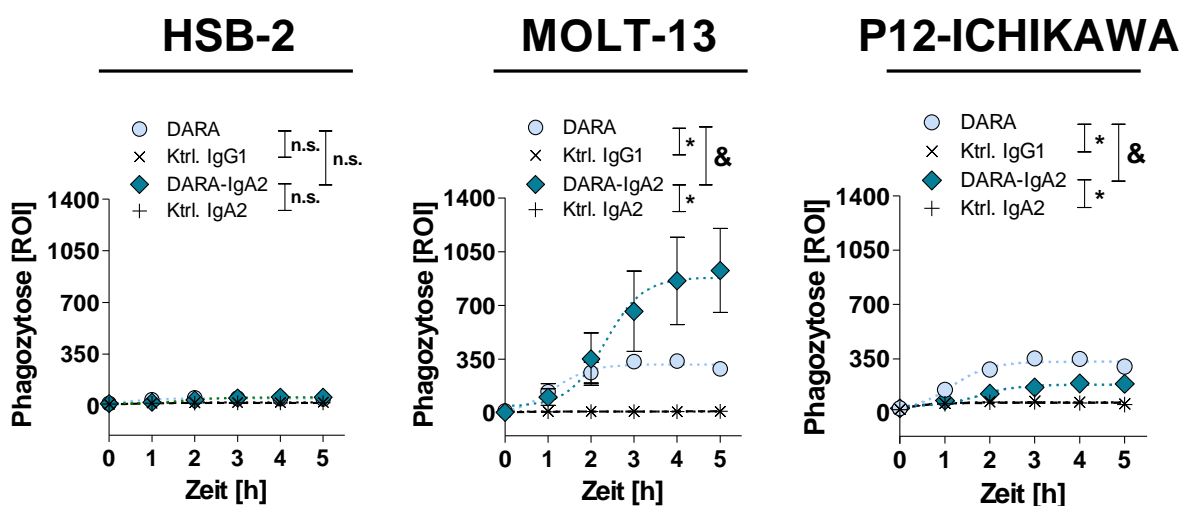


Abbildung 33: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von CD38-positiven T-ALL-Zellen.

Die T-ALL-Tumorzelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA dienen als Zielzellen. Als Effektoren wurden humane unpolarisierte Makrophagen (M0-Typus) herangezogen (E:T = 1:1). Die CD38-gerichteten Antikörper DARA und DARA-IgA2 bzw. die Kontrollantikörper (Ktrl. IgG1, Ktrl. IgA2) wurden mit 10 µg/ml eingesetzt (Kontrollantikörper = Cetuximab-Varianten).

Abb. 33 ff.

Die zeitabhängige Phagozytose wurde mittels Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie (IncuCyte-System) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM je Zeitpunkt von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollantikörpern, & statistisch signifikanter Unterschied zwischen DARA-IgG1 und DARA-IgA2, n.s. nicht signifikant. ROI = red object counts per image.

In der Neutrophilen-vermittelten ADCC fand keine Lyse von HSB-2- bzw. MOLT-13-Zellen statt, unabhängig vom verwendeten Daratumumab-Isotyp (Abbildung 34). Lediglich die P12-ICHIKAWA-Zellen konnten mithilfe des DARA-IgA2 spezifisch durch Neutrophile eliminiert werden (Abbildung 34, rechts, maximale Lyse von $22,33 \pm 4,80$ % bei $10 \mu\text{g/ml}$).

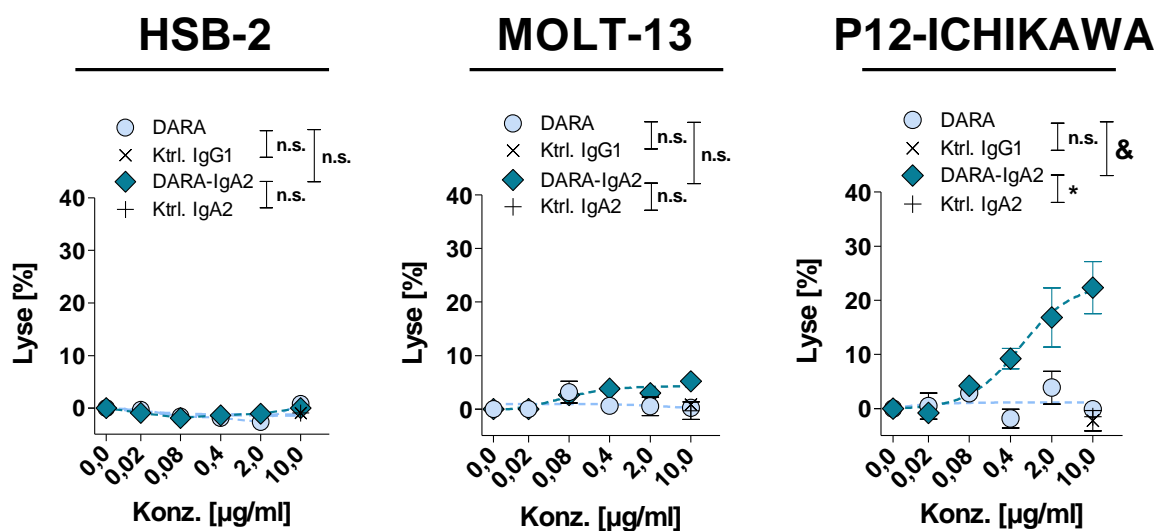


Abbildung 34: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegen T-ALL-Zellen.

Als Zielzellen im ^{51}Cr Freisetzungstest fungierten die Tumorzelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA. Neutrophile wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert und dienten als Effektoren (E:T = 80:1). Die CD38-gerichteten Antikörper DARA und DARA-IgA2 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die Konzentration der Kontrollantikörper (Cetuximab-Varianten) betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (P12-ICHIKAWA) bzw. vier (HSB-2 und MOLT-13) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zu Kontrollantikörpern, & statistisch signifikanter Unterschied zwischen DARA-IgG1 und DARA-IgA2, n.s. nicht signifikant.

Die CD38-Antikörper basierend auf Daratumumab eignen sich somit generell für die Eliminierung von T-ALL-Zellen durch myeloische Zellen, jedoch scheint die Aktivität limitiert zu sein. Ein Grund hierfür könnte die im Vergleich zu CD38 hohe Expression an CD47 der verwendeten Zelllinien sein (Abbildung 31), wodurch die myeloischen Zellen in ihrer Funktion inhibiert werden. Um die zytotoxische Aktivität der myeloischen Zellen zu erhöhen, bietet sich folglich eine Blockade des CD47-SIRP α -Checkpoints zusätzlich zum Einsatz von therapeutischen Antikörpern an.

3.3.2 Einfluss der genetischen Ablation von CD47 und QPCTL in T-ALL-Zellen auf die antikörperinduzierte zytotoxische Aktivität myeloischer Zellen

Um die CD47-SIRP α -Achse zu unterbinden wurden zunächst CD47- und QPCTL-Knock-Out-Mutanten der Zelllinie MOLT-13 nach dem CRISPR/Cas-Verfahren hergestellt. In die MOLT-13-Kontrollzelllinie (Ktrl.) wurde die Cas9 ohne spezifische *guide* RNA (gRNA) transfiziert.

Der CD47-Knock-Out (CD47 KO) ließ sich durchflusszytometrisch über die fehlende Bindung eines CD47-Antikörpers bestätigen (Abbildung 35). Die CD38-Expression der Knock-Out-Varianten im Vergleich zur Kontrollzelllinie blieben hingegen unverändert (Abbildung 35). Dies ist relevant, um einen adäquaten Vergleich der MOLT-13-Varianten untereinander zu gewährleisten.

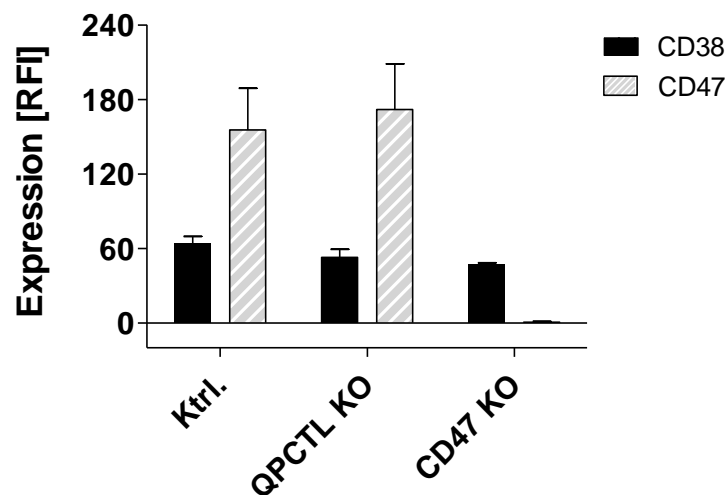


Abbildung 35: CD38- und CD47-Expressionen von MOLT-13-Zellen mit genetischer Ablation der QPCTL und von CD47 im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die CD38- und CD47-Expression auf MOLT-13 QPCTL KO und MOLT-13 CD47 KO im Vergleich zu Kontrollzellen (Ktrl.) wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Eingesetzt wurde der CD38-Antikörper HB-7 und der CD47-Antikörper B6H12 (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$). Zur Detektion dienten FITC-konjugierte anti-Maus IgG-Fc F(ab')₂-Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) von drei unabhängigen Experimenten.

Da die Expression der QPCTL nicht durchflusszytometrisch analysiert werden konnte, wurden Zelllysate der MOLT-13-Varianten generiert und anschließend die QPCTL über einen Immunblot nachgewiesen (Abbildung 36). Während schwache, jedoch spezifische Banden der QPCTL bei den Kontrollzellen und der CD47 KO-Zellen ersichtlich waren, deutet das Fehlen der Bande bei den QPCTL KO-Zellen auf einen erfolgreichen genetischen Knock-Out hin.

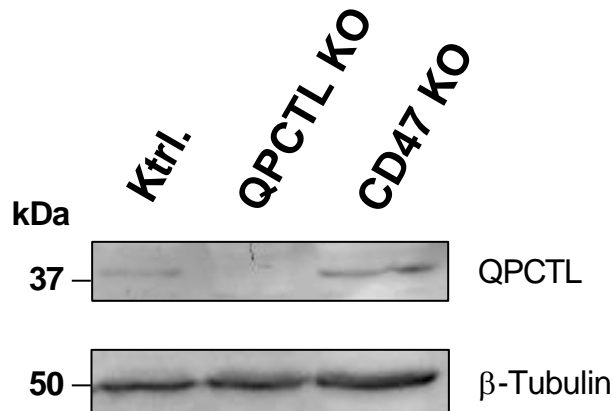


Abbildung 36: Immunblot zum Nachweis der Isoglutaminylzyklase QPCTL in MOLT-13-Varianten. Zelllysate der MOLT-13-Kontrollzellen, QPCTL KO und CD47 KO wurden elektrophoretisch (60 µg pro Spur) aufgetrennt und die Proteine anschließend über das Halbtrocken-Blotverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der QPCTL wurde ein HRP-gekoppelter QPCTL-gerichteter Antikörper verwendet. B-Tubulin diente als Ladekontrolle. kDa = Kilodalton.

Nichtsdestotrotz lässt sich über die Durchflusszytometrie ein QPCTL Knock-Out indirekt vermuten: die differenzielle Bindung des SIRP α -Fc als auch des CD47-gerichteten monoklonalen Antikörpers CC2C6, die beide Pyroglutamat-abhängig binden^{195,196}, weisen auf ein Fehlen des Pyroglutamats in den QPCTL KO-Zellen hin (Abbildung 37). Dass das SIRP α -Fc eine noch vergleichsweise starke Bindung aufzeigt, liegt möglicherweise an der höheren Affinität des SIRP α -Fc im Gegensatz zum nativen SIRP α .²²⁶ Mit dem CC2C6-Antikörper war hingegen eine deutliche Bindungsreduktion von 78 % bei den QPCTL KO-Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Bei den CD47 KO-Zellen war weder eine Bindung mit dem SIRP α -Fc noch mit dem CC2C6 zu detektieren, was eindeutig auf eine erfolgreiche Ablation des CD47-Gens hinweist.

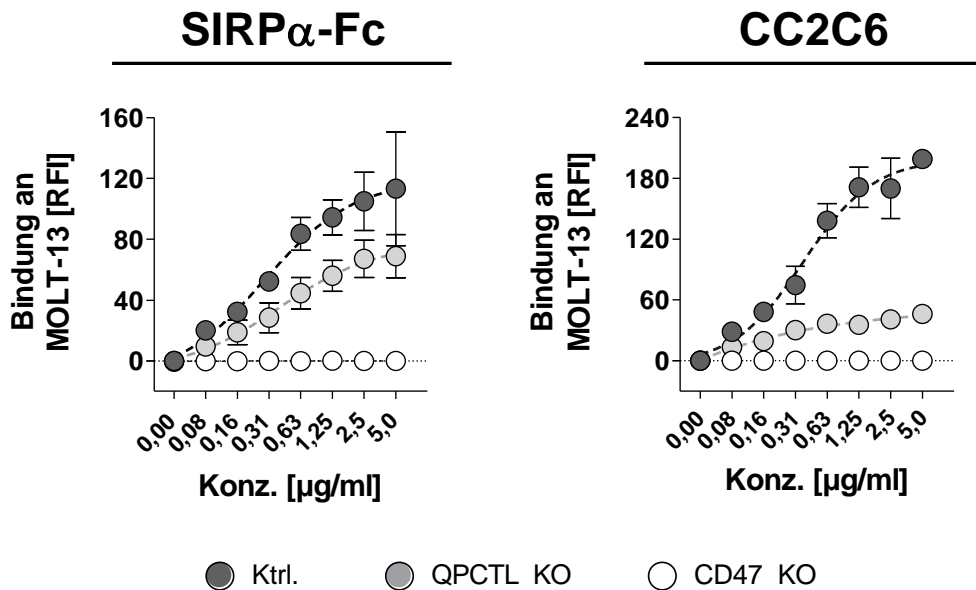


Abbildung 37: Bindung von SIRP α -Fc und des CD47-Antikörpers CC2C6 an MOLT-13-Varianten.

Die konzentrationsabhängige Bindung des Antikörpers CC2C6 und SIRP α -Fc wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie analysiert. Zur Detektion wurden FITC-konjugierte anti-human IgG bindende F(ab)₂-Fragmente (SIRP α -Fc) oder FITC-konjugierte anti-Maus IgG-bindende F(ab')₂-Fragmente (CC2C6) verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) aus drei unabhängigen Experimenten.

Als nächster wichtiger Schritt wurde die antikörperabhängige zytotoxische Aktivität von Makrophagen und Neutrophilen gegenüber den Knock-Out-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollzellen untersucht.

In den ADCP-Versuchen wurde ersichtlich, dass beide Knock-Out-Mutanten eine signifikant erhöhte Phagozytose (dargestellt ist die maximale Phagozytose bei 4 h) im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl mit DARA als IgG1 (indiziert durch %) als auch DARA-IgA2 (indiziert durch §) aufweisen. Dabei lagen die ROI-Werte der Kontrolle bei $54,83 \pm 17,89$ (DARA) und $69,06 \pm 21,83$ (DARA-IgA2). Bei den Phagozytosewerten der KO-Varianten waren keine großen Unterschiede zu verzeichnen: ROI (DARA) = $217,61 \pm 47,12$ (QPCTL KO) vs. $206,95 \pm 33,31$ (CD47 KO) und ROI (DARA-IgA2) = $242,22 \pm 95,52$ (QPCTL KO) vs. $232,89 \pm 64,17$ (CD47 KO).

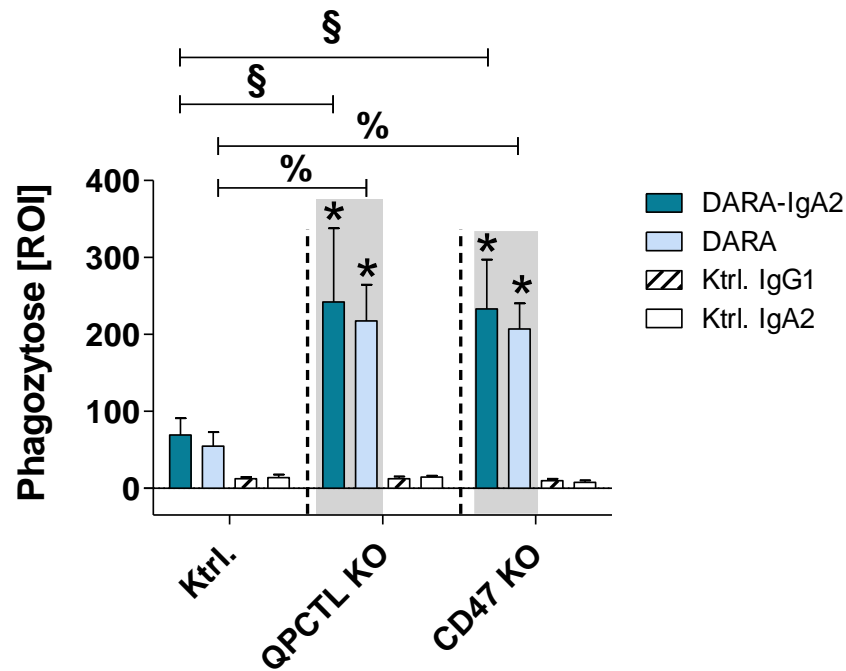


Abbildung 38: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von MOLT-13-Zellen.

Die Phagozytose von MOLT-13 KO-Varianten und Kontrollzellen wurde mittels automatisierter Hochdurchsatz-fluoreszenzmikroskopie analysiert. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) wurden als Effektoren herangezogen (E:T = 1:1). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt (Kontrollantikörper = Cetuximab-Varianten). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der maximalen Phagozytoseraten nach 4 h von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikante Unterschiede zum Kontrollantikörper, %/§ statistisch signifikante Unterschiede zwischen MOLT-1- Kontrollzellen und MOLT-13 KO-Varianten mit DARA-IgG1 (%) und DARA-IgA2 (§), ROI = red object counts per image.

Bei der Neutrophilen-vermittelten Zytotoxizität (Abbildung 39) zeigte sich, dass lediglich DARA-IgA2 eine spezifische Tumorzelllyse bei beiden Knock-Out-Zellen induziert, die signifikant höher im Vergleich zur Kontrollzelllinie war. Die Lyseraten beliefen sich auf $11,02 \pm 4,46$ (QPCTL KO) und $27,58 \pm 10,16$ (CD47 KO). Somit war die Lyse der CD47 KO-Zellen um das 2,5-Fache höher als die der QPCTL KO-Zellen.

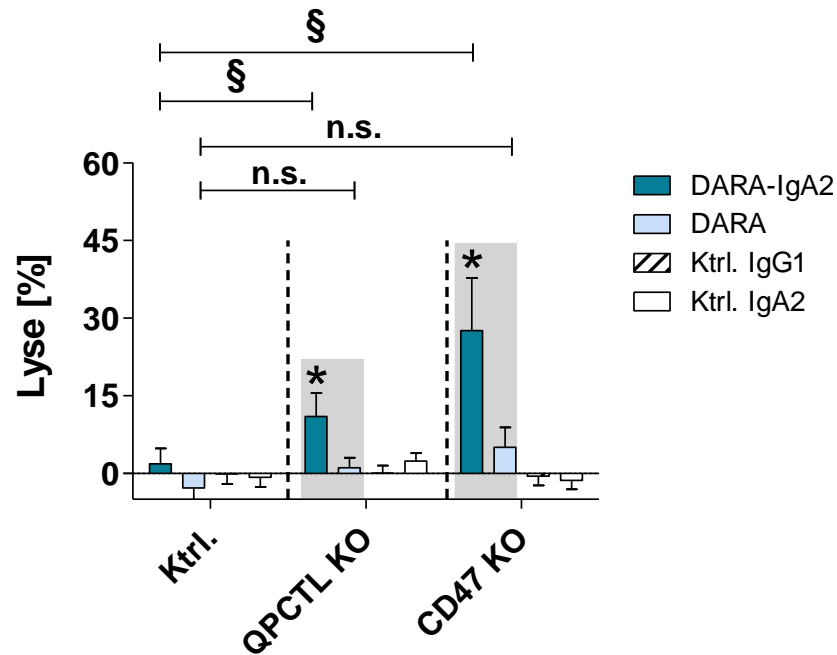


Abbildung 39: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber MOLT-13-Zellen. Als Zielzellen in $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstests fungierten die MOLT-13 QPCTL KO- und CD47 KO-Varianten sowie die Kontrollzellen. Aus peripherem Blut isolierte Neutrophile dienten als Effektoren (E:T = 80:1). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt (Kontrollantikörper = Cetuximab-Varianten). Dargestellt sind die Mittelwerte der Lyseraten \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, § statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und KO-Varianten mit DARA-IgA2.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass eine Inhibition der QPCTL eine potenziell gute Strategie darstellt, um die Makrophagen-vermittelte ADCP zu erhöhen. Es zeigte sich jedoch auch, dass bei der Neutrophilen-vermittelten ADCC der Gesamtverlust der CD47-Expression die größtmögliche Aktivierung der Effektoren begünstigt.

3.3.3 Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion mit CD47-Antikörpern

Nachdem die genetische Ablation von CD47 die Aktivität der Effektorzellen in Kombination mit CD38-gerichteten Antikörpern *in vitro* steigern konnte, sollte der Einfluss einer biologischen Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion mit CD47-Antikörpern auf die ADCP und auf die Neutrophilen-vermittelte ADCC untersucht werden. Als spezifischer CD47-Blockade-antikörper wurde der im Labor produzierte Antikörper hu5F9-IgG2 σ ⁷⁶ eingesetzt, dessen variable Regionen aus dem in klinischen Studien getesteten Magrolimab (hu5F9-IgG4) stammen²¹⁶, wobei hu5F9-IgG2 σ eine modifizierte IgG2-Variante ist, die keine Fc-Rezeptorbindung aufweist (indiziert durch σ).

3.3.3.1 Einfluss der CD47-Blockade auf die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose von Tumorzellen

Für die ADCP wurde das Magrolimab-Derivat hu5F9-IgG2 σ unter sättigender Konzentration (20 μ g/ml) eingesetzt. Aus Bindungstitrationen auf der Zelllinie MOLT-13 ging hervor, dass eine Sättigung ab 2 μ g/ml eintritt (Anhang: Abbildung 53). Die Konzentrationen der Daratumumab-Varianten als auch der Kontrollantikörper beliefen sich wie bei den initialen ADCP-Versuchen (Kapitel 3.4.1) auf 10 μ g/ml.

Aus den ADCP-Versuchen ging hervor, dass die CD47-Blockade die Phagozytose von HSB-2-, MOLT-13- und P12-ICHIKAWA-Zellen unabhängig vom Daratumumab-Isotyp signifikant zu den Versuchen ohne CD47 Block steigerte (Abbildung 40). Mit gleichzeitiger CD47-Blockade war bei den HSB-2-Zellen kaum ein Unterschied zwischen DARA (ROI = 38,93 \pm 4,84) und DARA-IgA2 (ROI = 42,04 \pm 9,90) zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war DARA-IgA2 (ROI = 939,32 \pm 210,82) auf den MOLT-13-Zellen tendenziell leicht dem DARA (ROI = 669,56 \pm 193,47) überlegen, wobei hier keine statistische Signifikanz resultierte. Bei den P12-ICHIKAWA induzierte DARA mit CD47 Block (ROI = 876,83 \pm 88,30) eine signifikant höhere Phagozytose als die IgA2-Variante (ROI = 647,72 \pm 66,54). Anhand der ROI-Werte ist des Weiteren ersichtlich, dass die HSB-2-Zellen insgesamt weniger phagozytiert werden als die MOLT-13- bzw. P12-ICHIKAWA-Zellen. Möglicherweise ist dies auf die geringe CD38-Expression zurückzuführen.

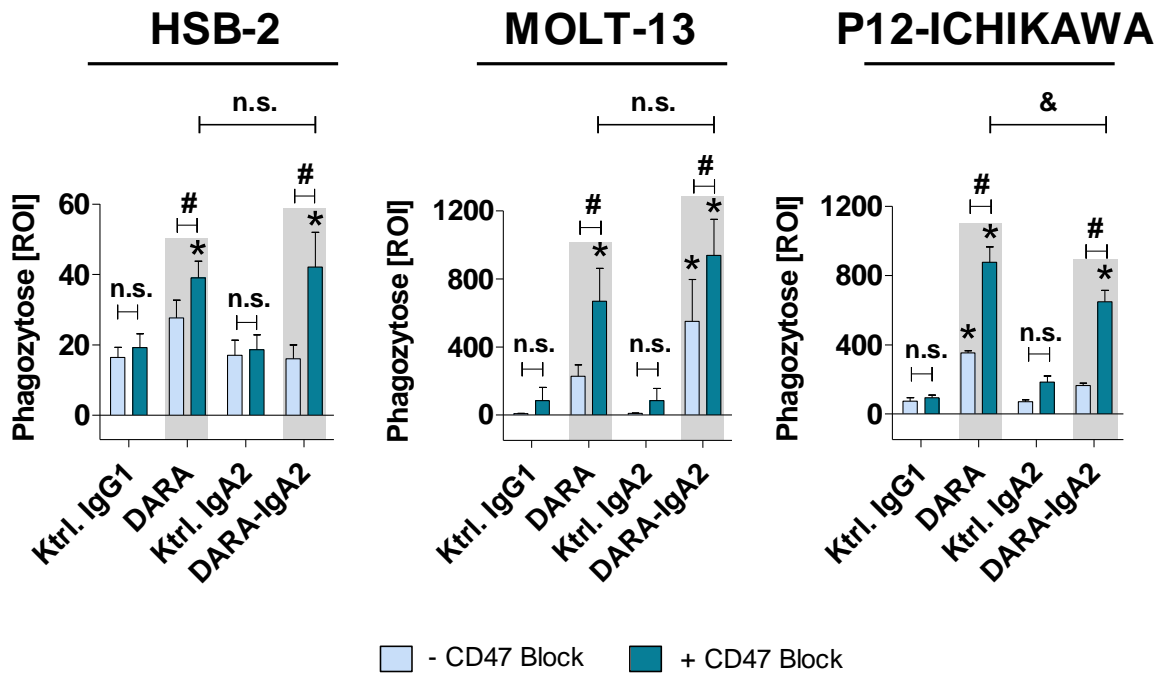


Abbildung 40: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von T-ALL-Zellen mit biologischer CD47-Blockade. Die Phagozytose wurde mit automatisierter Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie analysiert. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) wurden als Effektorzellen herangezogen (E:T = 1:1). Die DARA- und Kontrollantikörper (Cetuximab-Varianten) wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Der CD47-Blockadeantikörper hu5F9-IgG2σ mit 20 µg/ml. Dargestellt sind die ROI-Mittelwerte ± SEM der maximalen Phagozytoseraten nach 4 h von drei (P12-ICHIKAWA), vier (HSB-2) bzw. fünf (MOLT-13) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikante Unterschiede zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikante Unterschiede zwischen -CD47 Block und +CD47 Block, & statistisch signifikanter Unterschied zwischen DARA und DARA-IgA2 jeweils mit CD47 Block, n.s. nicht signifikant, ROI = red object counts per image.

Da Tumorzelllinien nur bedingt die Heterogenität von Tumorzellen aus Patienten widerspiegeln, sollte nachfolgend überprüft werden, ob eine CD47-Blockade die antikörperabhängige Phagozytose von Patientenproben steigern kann. Publierte Daten ließen bereits erkennen, dass eine CD47-Blockade mit hu5F9-IgG2σ in Kombination mit DARA die Phagozytose von T-ALL-Patientenproben erhöht.²³⁵ Deshalb konzentrierten sich die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell auf die IgA2-Variante von Daratumumab. Es konnte Material von drei unterschiedlichen T-ALL-Patienten (eingefrorene Patiententumorzellen, die zuvor in immundefizienten Mäusen expandiert wurden) herangezogen werden, die sowohl CD38 als auch CD47 exprimieren (Abbildung 41).

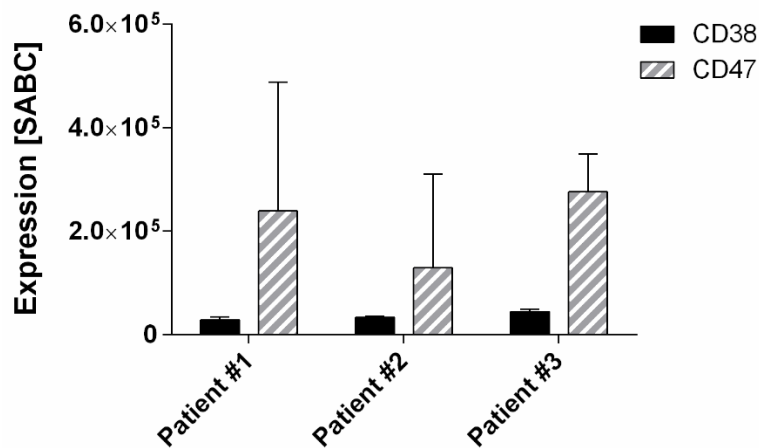


Abbildung 41: Expression der Oberflächenproteine CD38 und CD47 auf Tumorzellen von drei T-ALL-Patienten. Die CD38- und CD47-Expression wurde mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt und die spezifischen Antigenbindungsstellen pro Zelle (specific antigen binding sites per cell, SABC) unter Verwendung des QIFIKIT[®] ermittelt. Eingesetzt wurden die Antikörper HB-7 (CD38) und B6H12 (CD47) unter sättigenden Bedingungen (10 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse der Phagozytoseversuche mit unpolarisierten Makrophagen gesunder Spender sind in Abbildung 42 dargestellt. Während DARA-IgA2 alleine lediglich eine spezifische Phagozytose bei einer Patientenprobe induzierte, konnte durch den Einsatz des CD47-Blockadeantikörpers die DARA-IgA2 induzierte Phagozytose in fünf von sechs Fällen signifikant gesteigert werden. Interessanterweise war die Phagozytose aller drei Patientenproben mit dem Kontrollantikörper und CD47-Blockade mit Makrophagen von Spender 1 bereits höher als mit DARA-IgA2 ohne CD47-Blockade. Möglicherweise führte bei diesem Spender der CD47-Blockadeantikörper zu einer moderaten Aktivierung der Makrophagen durch die Blockade der *cis*-Interaktion zwischen dem Makrophagen-ständigen CD47 und SIRPα.²³⁶ Die hier generierten Daten zeigen das Potential der Kombination bestehend aus DARA-IgA2 plus CD47-Blockadeantikörper, da jedoch nur eine limitierte Anzahl an Patientenproben/Material zur Verfügung stand, sind weitere Versuche mit mehreren Patientenproben nötig, um den Trend zu bestätigen.

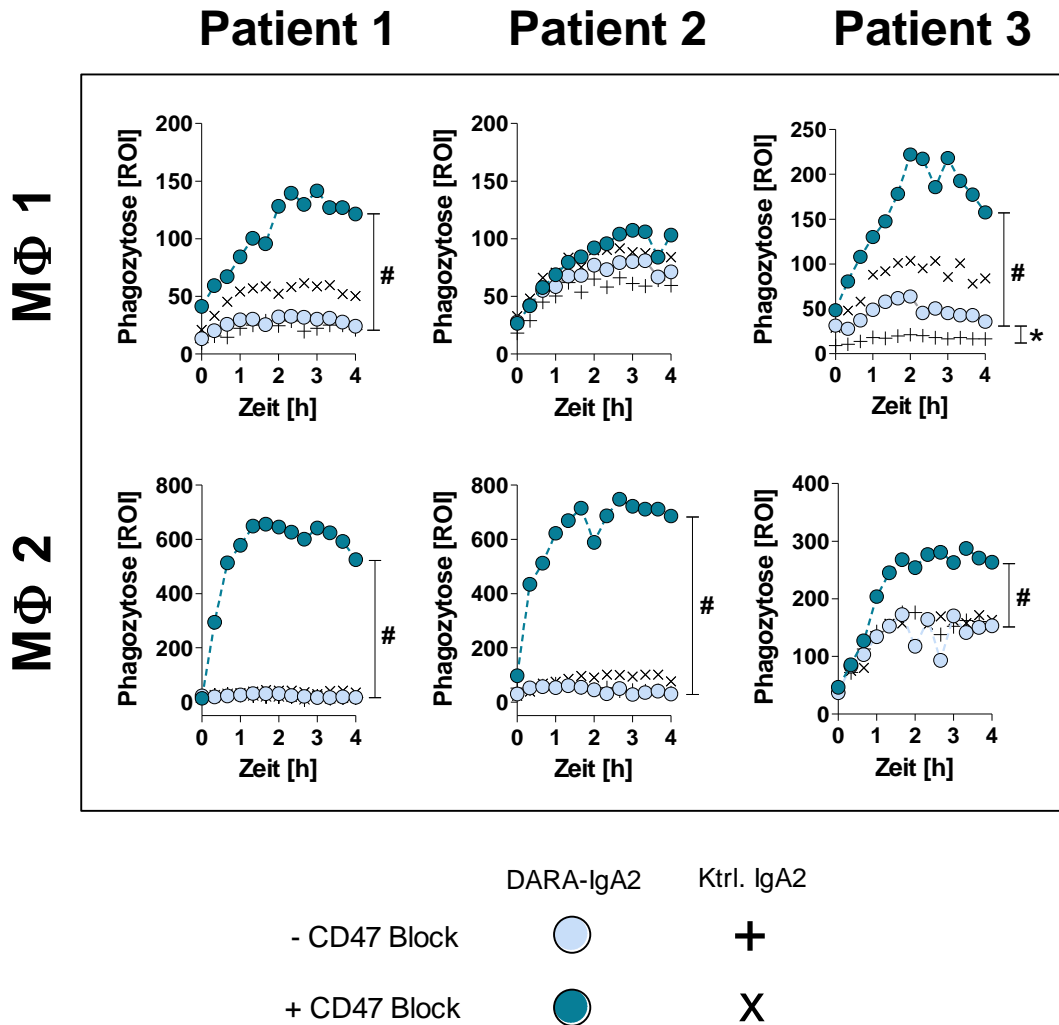


Abbildung 42: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von T-ALL-Patientenzellen mit biologischer CD47-Blockade.

Die Phagozytose wurde mittels automatisierter Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie analysiert. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) zweier Spender (MΦ 1 und MΦ 2) wurden als Effektoren herangezogen (E:T = 1:1). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml, der CD47-Blockadeantikörper hu5F9 IgG2σ mit 20 µg/ml, eingesetzt (Kontrollantikörper = CTX-IgA2). Dargestellt sind die jeweiligen Phagozytoseraten in Abhängigkeit von der Zeit. Statistik: einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikante Unterschiede zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikante Unterschiede zwischen -CD47 Block und +CD47 Block, ROI = red object counts per image.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich die Makrophagen-vermittelte Phagozytose von T-ALL-Zelllinien und Patientenproben über CD38-gerichtete Antikörper unter Zuhilfenahme einer biologischen Blockade der CD47-SIRPα-Interaktion erhöhen ließ.

3.3.3.2 Einfluss der CD47-Blockade auf die antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Lyse von T-ALL-Zellen

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, in wie weit die biologische Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion auch die Zytotoxizität von Neutrophilen gegenüber T-ALL-Zellen nach Einsatz von CD38-gerichteten Antikörpern beeinflusst. In diesem Abschnitt ließen sich nur die proliferierenden Tumorzelllinien analysieren, da sich die Patientenproben aufgrund einer fehlenden Chromierung nicht für $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsexperimente eigneten. Analog zu vorhergehenden Versuchen in Kapitel 3.3.3.1 wurde der hu5F9-IgG2 σ als CD47-Blockadeantikörper mit 20 $\mu\text{g/ml}$ sowie die Daratumumab-Varianten DARA und DARA-IgA2 bzw. korrespondierende (auf Cetuximab-basierende) Kontrollantikörper mit 10 $\mu\text{g/ml}$ nach Ermittlung der maximalen Lyse in Kapitel 3.3.1 eingesetzt.

In ADCC-Versuchen ohne CD47-Blockade wurde ersichtlich, dass lediglich die P12-ICHIKAWA-Zellen unter Verwendung des DARA-IgA2 durch Neutrophile lysiert werden konnten (Abbildung 34). Eine Kombination dieses Antikörpers mit dem CD47-Blockadeantikörper zeigte nun, dass sich eine spezifische Lyse von allen untersuchten Zelllinien induzieren ließ (Abbildung 43). Für die HSB-2 wurden Lyseraten von $15,25 \pm 2,85 \%$ generiert. Die MOLT-13-Zellen konnten zu $31,06 \pm 4,46 \%$ und die P12-ICHIKAWA sogar zu $49,39 \pm 2,07 \%$ lysiert werden. Neben Daratumumab als IgA2 profitierte ebenfalls die IgG1-Variante von einer CD47-Blockade, jedoch nur bei den P12-ICHIKAWA-Zellen mit Lyseraten von $25,80 \pm 5,48 \%$.

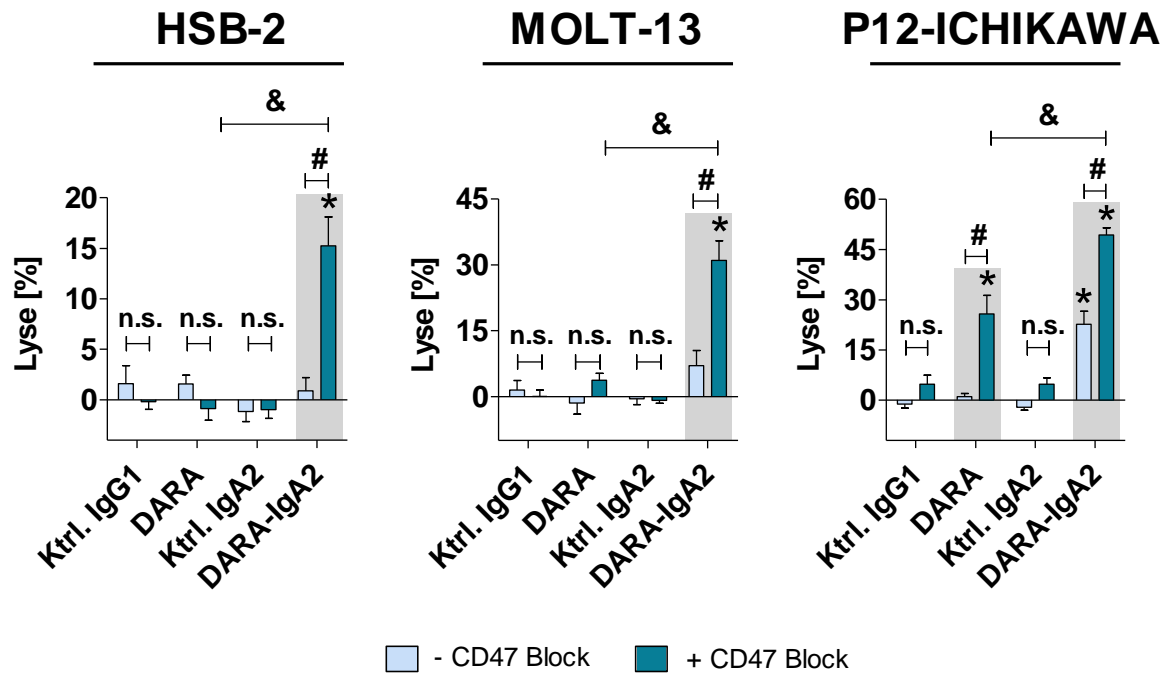


Abbildung 43: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber T-ALL-Zellen mit biologischer Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion.

Als Zielzellen in ^{51}Cr Chromfreisetzungstests fungierten die T-ALL-Zelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA. Humane Neutrophile dienten als Effektoren (E:T = 80:1). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$, CD47-Blockadeantikörper hu5F9-IgG2 σ mit 20 $\mu\text{g/ml}$, eingesetzt (Kontrollantikörper = Cetuximab-Varianten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von fünf (HSB-2) bzw. sechs (MOLT-13 und P12-ICHIKAWA) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikanter Unterschied zwischen -CD47 Block und +CD47 Block, & statistisch signifikanter Unterschied zwischen DARA-IgG1 + CD47 Block und DARA-IgA2 + CD47 Block, n.s. nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine biologische Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion die Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber T-ALL-Zellen vor allem unter Verwendung des Daratumumab als IgA2 verbessert.

3.3.4 Behandlung von T-ALL-Zellen mit Retinsäure führt zur gesteigerten Tumorzelleliminierung durch Daratumumab-Varianten in Kombination mit einer CD47-Blockade

Obwohl eine CD47-Blockade einen positiven Effekt auf die Eliminierung der HSB-2-Zellen durch Makrophagen bzw. Neutrophile zeigte, sind die Phagozytose- und Lyseraten im Vergleich zu MOLT-13 und P12-ICHIKAWA relativ gering. Ein möglicher Grund hierfür könnte die vergleichsweise niedrige Expression von CD38 sein. Studien zeigten, dass nach Behandlung

von Myelomzellen mit Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, ATRA) die Expression von CD38 erhöht und die Aktivität von Daratumumab verbessert werden konnte.²³⁷

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Behandlung von T-ALL-Zellen, hier am Beispiel der Zelllinie HSB-2, mit ATRA auf die Daratumumab-vermittelte Tumorzelleliminierung untersucht werden.

Zur Ermittlung der optimalen ATRA-Konzentration bzw. des Behandlungszeitraums wurden HSB-2-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an ATRA und für unterschiedliche Zeiten behandelt. Anschließend wurde die Expression von CD38 durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 44). Der größte Anstieg war bei einer Konzentration von 1 μM zu verzeichnen und setzte bei einer Behandlungsdauer zwischen 48 h und 72 h ein. Signifikante Unterschiede zu nicht-behandelten Zellen waren bereits ab einer Konzentration von 1 nM ATRA ersichtlich.

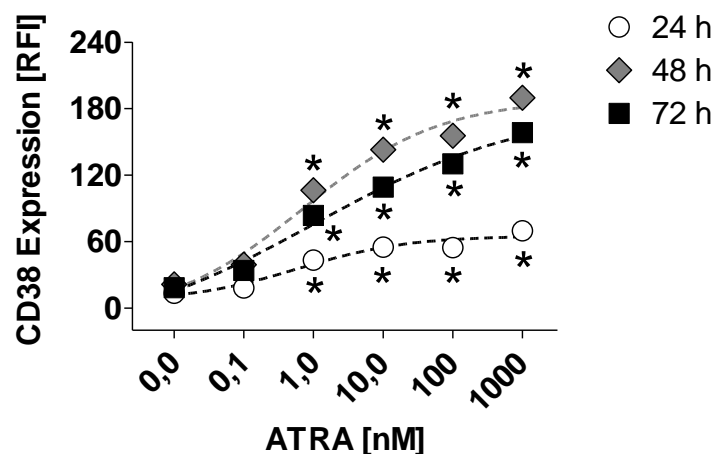


Abbildung 44: Zeitabhängiger Anstieg der CD38-Expression auf HSB-2-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATRA.

HSB-2-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATRA behandelt. Die CD38-Expression wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Als Primärantikörper fungierte der CD38-gerichtete Antikörper HB-7, dessen Bindung mit FITC-konjugierten anti-Maus IgG-F(ab')₂-Fragmenten nachgewiesen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zur Null-Kontrolle (0 nM ATRA).

Für die nachfolgenden Experimente wurden die Zellen mit 1 μM ATRA für 72 h vorbehandelt. In der quantitativen durchflusszytometrischen Analyse konnte die CD38-Expression durch ATRA von anfänglichen 10972 ± 45 SABC um das 25-Fache auf 276678 ± 990 SABC gesteigert werden (Abbildung 45).

Als Derivat des Vitamin A ist ATRA in der Lage an Retinoidrezeptoren, die zur Familie der Kernrezeptoren zählen, zu binden. Sobald Kernrezeptoren an Retinoide gebunden vorliegen, wirken sie als Transkriptionsfaktoren und verändern die Expression unterschiedlicher Gene.^{238–240}

Um einen Einfluss von ATRA auf die CD47-Expression auszuschließen, wurde diese ebenfalls durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei ergab sich keine Veränderung der CD47-Expression nach ATRA-Behandlung. Ebenfalls keinen Einfluss scheint ATRA auf die Aktivität der QPCTL zu haben, da die Bindung des Pyroglutamat-abhängigen CD47-Antikörpers CC2C6 unverändert vorlag (Abbildung 45).

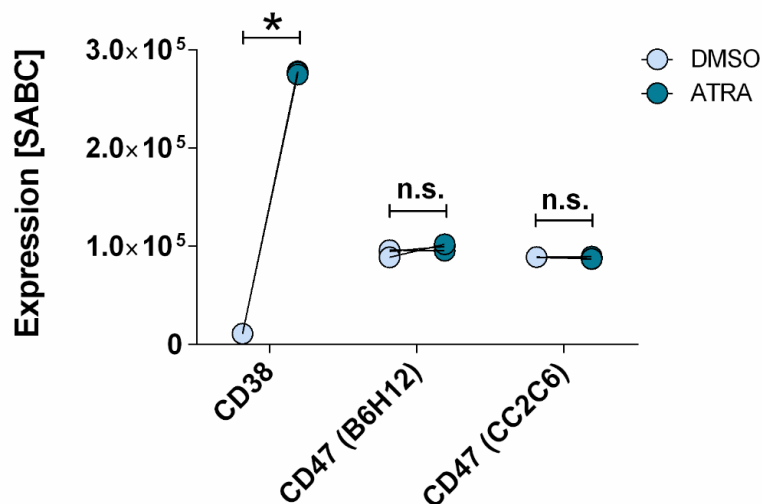


Abbildung 45: Die ATRA-Behandlung auf HSB-2-Zellen führt zum Anstieg der CD38-Expression, während die CD47-Expression unverändert bleibt.

HSB-2-Zellen wurden mit 1 μM ATRA oder DMSO für 72 h behandelt und die Antigenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Die spezifischen Antigenbindungsstellen pro Zelle (specific antigen binding sites per cell, SABC) wurden unter Verwendung des QIFIKIT[®] ermittelt. Als Primärantikörper dienten die Antikörper HB-7 (CD38), B6H12 (CD47 gesamt) und CC2C6 (CD47 mit N-terminalem Pyroglutamat) jeweils mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dargestellt sind die Ergebnisse der jeweiligen Experimente ($n=3$) nach DMSO-Kontroll- oder ATRA-Behandlung. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zwischen DMSO und ATRA, n.s. nicht signifikant.

In den ADCP-Versuchen mit HSB-2-Zellen wurden die Antikörper mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt, der CD47-Antikörper hu5F9-IgG2 σ mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Abbildung 46 zeigt die Makrophagen-vermittelte Phagozytose von HSB-2-Zellen nach 4 h, der Zeitpunkt an dem die maximale Phagozytose erreicht wurde. Wichtig zu erwähnen ist, dass die ATRA-Behandlung die Bindungskapazität des CD47-Blockadeantikörpers hu5F9-IgG2 σ nicht beeinflusst (Anhang: Abbildung 54).

Die Phagozytosewerte waren mit der Kombination aus ATRA-Behandlung und CD47-Blockade am höchsten, und zwar mit beiden DARA-Isotypen. Die ROI-Werte beliefen sich auf $156,50 \pm 41,38$ für DARA und $198,75 \pm 58,91$ für DARA-IgA2. Bei DARA reichte auch die ATRA-Behandlung alleine für eine, wenn auch geringe, Steigerung der Phagozytose aus ($ROI 85,17 \pm 32,22$), während die alleinige CD47-Blockade hier keinen Effekt hatte ($ROI 43,33 \pm 11,67$). Ohne ATRA und CD47-Blockade (DMSO) war praktisch keine Phagozytose zu verzeichnen ($ROI 30,50 \pm 3,78$). Die zusätzliche ATRA-Behandlung in Kombination mit einer CD47-Blockade führte folglich zu einem Anstieg um das 3,6-Fache gegenüber der CD47-Blockade alleine.

Unter Einsatz von DARA-IgA2 waren geringe Steigerungen der Phagozytose mit einer CD47-Blockade alleine ($ROI 85,17 \pm 30,63$) als auch ATRA-Behandlung alleine ($ROI 83,5 \pm 29,76$) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($ROI 26,50 \pm 4,90$) zu sehen. Ein Anstieg um das 2,3-Fache gegenüber der CD47-Blockade alleine konnte mit ATRA plus CD47 Block verzeichnet werden.

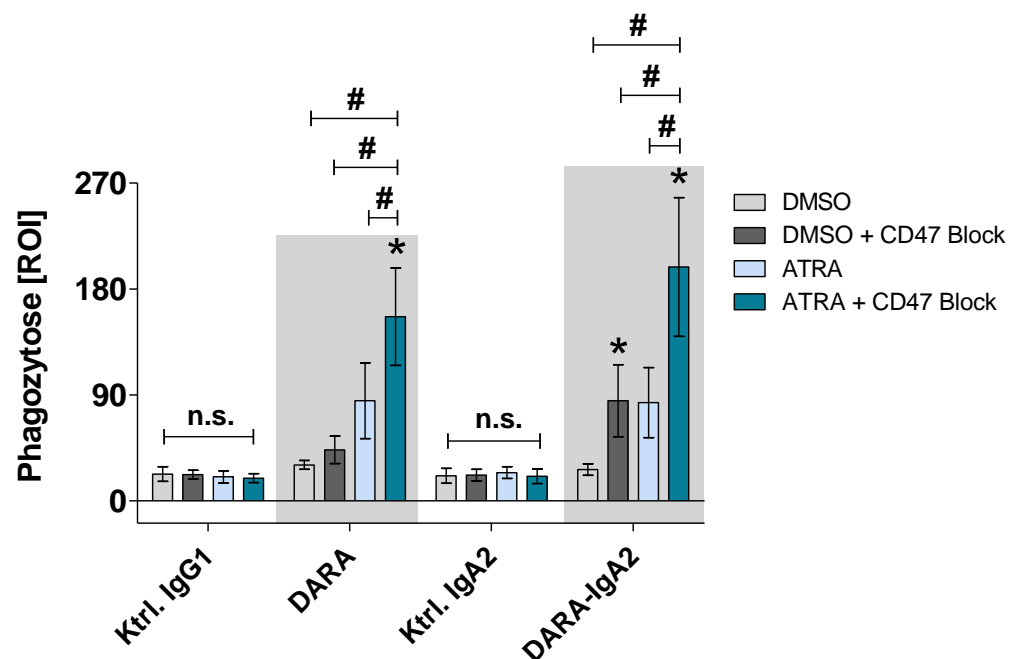


Abbildung 46: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von HSB-2-Zellen nach ATRA-Behandlung mit biologischer CD47-Blockade.

HSB-2-Zellen wurden für 72 h mit ATRA ($1 \mu M$) oder DMSO behandelt. Die Phagozytose der Tumorzellen wurde mittels automatisierter Hochdurchsatzfluoreszenzmikroskopie analysiert. Unpolarisierte humane Makrophagen (M0-Typus) wurden als Effektoren herangezogen ($E:T = 1:1$). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von $10 \mu g/ml$, CD47-Blockade-antikörper hu5F9 IgG2 σ mit $20 \mu g/ml$, eingesetzt. Als Kontrollantikörper dienten Cetuximab-Varianten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der maximalen Phagozytoseraten nach 4 h von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikante Unterschiede zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Behandlungen, n.s. nicht signifikant, ROI = red object counts per image.

Bei den Neutrophilen-vermittelten ADCC-Versuchen mit HSB-2-Zellen konnte lediglich die IgA2-Variante des Daratumumabs eine spezifische Tumorzelllyse induzieren (Abbildung 47). Auch hier wurden die Antikörper mit einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 20 µg/ml (hu5F9-IgG2σ) eingesetzt.

Ähnlich wie in den ADCP-Experimenten generierte die Kombination bestehend aus einer ATRA-Behandlung und einer CD47-Blockade mit $68,03 \pm 6,44$ % die größte Tumorzelllyse. ATRA alleine war in der Lage eine Lyse von $45,07 \pm 7,92$ % zu induzieren, während die CD47-Blockade alleine lediglich auf $6,27 \pm 2,00$ % kam. Somit ist ATRA plus CD47-Blockade um das 10,9-Fache potenter als die CD47-Blockade ohne ATRA-Behandlung.

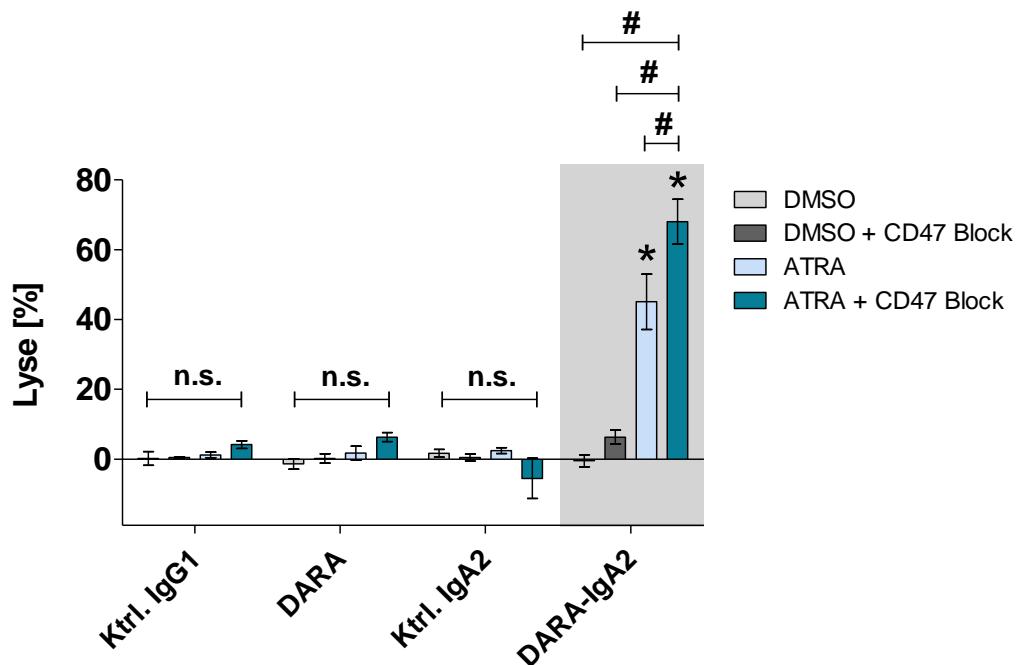


Abbildung 47: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber HSB-2-Zellen. HSB-2-Zellen wurden mit 1 µM ATRA oder DMSO für 72 h behandelt und fungierten als Zielzellen in ⁵¹Chromfreisetzungstests. Humane Neutrophile dienten als Effektoren (E:T = 80:1). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 20 µg/ml (CD47-Blockadeantikörper hu5F9-IgG2σ) eingesetzt. Als Kontrollantikörper dienten Cetuximab-Varianten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur, * statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollantikörper, # statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Behandlungen, n.s. nicht signifikant.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass eine Kombination bestehend aus der Behandlung von T-ALL-Zellen mit ATRA und der zusätzlichen Blockade der CD47-SIRPα-Interaktion eine stark ausgeprägte Tumorzellphagozytose bzw. Lyse durch myeloische Zellen induziert, vor allem unter Verwendung der DARA-IgA2 Variante.

4. Diskussion

Die initiale Therapie von Tumorerkrankungen basiert im Allgemeinen auf der chirurgischen Entfernung des Tumors, Chemotherapie oder Strahlentherapie. Nach einer anfänglich erfolgreichen Behandlung des Primärtumors unterliegen Patienten oftmals einem Rezidiv, da nicht alle im Organismus vorliegenden Tumorzellen wie Metastasen oder dormante Tumorzellen eliminiert werden.^{173,241}

Des Weiteren führt die fehlende Spezifität vor allem der Chemo- und Strahlentherapie zu schwerwiegenden Nebenwirkungen. Zusätzlich zu den Tumorzellen werden hier körpereigene, proliferierende Zellen wie etwa hämatopoetische Stammzellen angegriffen.^{242,243} Durch die Anwendung von antikörperbasierten Tumorimmuntherapien lässt sich der Angriff auf gesunde Zellen reduzieren und Tumorzellen gezielter durch die Aktivierung des Immunsystems zerstören.

Da Tumorzellen jedoch in der Lage sind eine Immunantwort abzuschwächen, beispielsweise durch die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen¹⁶², und nicht jede Immunzellpopulation gleichermaßen von den eingesetzten Antikörpern rekrutiert wird, besteht weiterhin ein großer Bedarf an Optimierung bestehender Therapien. Insbesondere Neutrophile profitieren nur bedingt von den in der Klinik eingesetzten IgG-Antikörpern, so dass Strategien für eine verbesserte Aktivierung der myeloischen Zellen entwickelt werden sollten. Die Kombination aus einer Immuncheckpoint-Blockade und dem Einsatz therapeutischer Antikörper könnte hierbei vielversprechende Erfolge erzielen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine CD47-SIRP α -Interaktionsblockade über die Verwendung eines CD47-Blockadeantikörpers oder der pharmakologischen Inhibition der Isoglutaminylyklase zusammen mit therapeutischen IgG-Antikörpern oder deren IgA2-Derivate präklinisch getestet.

4.1 Das Potential von IgA-Antikörpern zur effektiven Aktivierung myeloischer Zellen in der Tumorimmuntherapie

4.1.1 Vergleich der IgG- und IgA-vermittelten Rekrutierung

In der antikörperbasierten Tumorimmuntherapie werden vor allem Antikörper des IgG-Isotyps, vorzugsweise IgG1 bei der Immunsystemaktivierung, eingesetzt. Grund hierfür sind unter anderem eine lange Serumhalbwertszeit, die einfache Produktion sowie Reinigung und die effiziente Aktivierung von beispielsweise NK-Zellen oder des Komplementsystems.^{20,21,244}

Im Rahmen der Arbeit wurde beobachtet, dass IgA-Antikörper myeloische Zellen effizient aktivieren. Dabei induzierte eine IgA2-Variante des EGFR-gerichteten Antikörpers Cetuximab in ADCP-Versuchen mit den soliden Tumorzelllinien MDA-MB-468 und Kyse-30 gleichwertige Phagozytoseraten verglichen mit den IgG-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab.

Bei den T-ALL-Zelllinien waren die Ergebnisse heterogener: während die IgA2-Variante des CD38-gerichteten Antikörpers Daratumumab eine signifikant erhöhte Phagozytose von MOLT-13-Zellen im Vergleich zu Daratumumab als IgG1 induzierte, erzielte der IgG1 eine stärkere ADCP gegenüber P12-ICHIKAWA-Zellen.

Weitaus eindeutiger waren die Resultate bei den Neutrophilen-vermittelten ADCC-Versuchen. Die CTX-IgA2-Variante ermöglichte die höchste Tumorzelleliminierung aller verwendeten EGFR-positiven Tumorzelllinien (A431, MDA-MB-468, Kyse-30). Bei den T-ALL-Zelllinien konnte nur P12-ICHIKAWA durch Neutrophile lysiert werden. Auch hier zeigte sich, dass DARA-IgA2 dem IgG1-Isotyp von Daratumumab überlegen war. Zudem wurde bei den Karzinomzelllinien beobachtet, dass der IgG2-Antikörper Panitumumab stärkere Effekte in ADCC-Versuchen induziert als der IgG1-Antikörper Cetuximab.

Diese Ergebnisse decken sich mit bereits veröffentlichten Daten. In Bezug auf die unterschiedliche Aktivierung von IgG2 und IgG1 in Neutrophilen-vermittelten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Panitumumab bei Zelllinien mit geringer EGFR-Antigendichte Cetuximab überlegen ist.⁶⁶ Davon unabhängige Versuche zeigten ebenfalls, dass eine IgA-Variante von Cetuximab wesentlich effizienter Neutrophile aktiviert als der parentale IgG-Antikörper.⁶⁸ Neben EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern konnten auch IgA-Varianten des HER2-gerichteten Antikörpers Trastuzumab Neutrophile gegen beispielsweise die Mammakarzinomzelllinie SKBR3 aktivieren.²⁴⁵

Des Weiteren induzieren IgA-Varianten der CD20-gerichteten Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab die Eliminierung unterschiedlicher B-Lymphomzelllinien durch Makrophagen und Neutrophile. Dabei führten die IgA2-Varianten, insbesondere die von Obinutuzumab, auch *in vivo*, zu einer effektiven Reduktion der Tumorzelllast.⁷⁶ Neuroblastomzellen konnten effizienter mit einem anti-GD2 IgA-Antikörper als mit dem parentalen IgG durch Neutrophile lysiert werden²⁴⁶ und IgA-Antikörper gegen HLA Klasse-II-Moleküle bewirkten ebenfalls eine effektive Lyse von chronisch lymphatischen Leukämiezellen.⁷⁵

Dass IgA-Moleküle potente Aktivatoren für myeloische Zellen sind, liegt an dem IgA-bindenden Fc α -Rezeptor (CD89). Dieser ist ausschließlich auf myeloischen Zellen exprimiert und induziert eine starke intrazelluläre Signalkaskade.^{247,248} Untersuchungen in Neutrophilen zeigten, dass IgA-Moleküle mehr aktivierende Signale hervorbringen als IgG-Antikörper. Ein IgA-Molekül kann über seinen Fc-Teil zwei Fc α -Rezeptoren kreuzvernetzen und dadurch weitaus mehr Signale generieren als IgG-gebundene, aktivierende Fc γ -Rezeptoren (ein IgG-Molekül bindet einen Fc γ -Rezeptor).²⁴⁸

Das in dieser Arbeit generierte Fc-Rezeptorexpressionsprofil von M0-Makrophagen und Neutrophilen zeigte, dass Neutrophile weniger an aktivierenden Fc γ -Rezeptoren CD32a und CD64 exprimieren als Makrophagen. Die hohe CD16-Expression der Neutrophilen besteht aus CD16b²⁴⁹, einem Fc γ -Rezeptor, der keine ITAM-Domäne besitzt und als *decoy*-Rezeptor beschrieben wird.²⁵⁰ Die geringe Aktivierungskapazität der IgG-Moleküle lässt sich somit unter anderem auch auf das Abfangen der therapeutischen IgG-Antikörper durch CD16b zurückführen. Dies konnte auch durch Experimente belegt werden, in denen eine Blockade von CD16b auf Neutrophilen zu einer erhöhten CD32a-vermittelten ADCC gegenüber EGFR- und HER2-positive Tumorzellen unter Verwendung der therapeutischen IgG-Antikörper Cetuximab und Trastuzumab führte.²⁵¹

Aus den hier generierten Daten ging zudem hervor, dass Makrophagen besser durch IgG-Moleküle aktiviert werden können als Neutrophile. Die Beobachtung lässt sich ebenfalls anhand der Fc γ -Rezeptorexpression erklären. Während der inhibitorische Rezeptor CD32b vergleichsweise niedrig und kein CD16b exprimiert ist, werden vor allem CD32a und CD64 exprimiert, die eine Aktivierung begünstigen.

4.1.2 Modifikationen von IgA-Antikörpern zur Verbesserung der Serumhalbwertszeit

Obwohl IgA-Moleküle potente Aktivatoren myeloischer Zellen sind, ist zum derzeitigen Zeitpunkt noch kein therapeutischer IgA-Antikörper in der Klinik. Ein Grund hierfür ist die im Gegensatz zum IgG-Isotyp vergleichsweise geringe Serumhalbwertszeit (4-7 Tage vs. 21 Tage),^{21,252,253} aus der eine oftmalige Applikation des Antikörpers resultieren würde.

Die geringe Halbwertszeit ist vor allem auf die Bindung des IgA an den Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) der Hepatozyten in der Leber zurückzuführen, der die N-Glykosylierungen an Asparaginresten (zwei bei IgA1 und 4-5 bei IgA2 vs. eine bei IgG) erkennt und die Moleküle internalisiert⁷⁰ und der fehlenden Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), der eine Degradierung von IgG-Molekülen über die Rückführung der Antikörper in die Zirkulation ermöglicht.²⁵⁴

Durch die Substitution der Asparagine N166 und N337 des IgA2 mit den korrespondierenden Aminosäuren des IgA1 an gleicher Position (G166 und T337) konnte die Serumhalbwertszeit in Mäusen verlängert werden.³⁷ Der optimierte Antikörper wurde folglich als IgA2.0 bezeichnet, die Variante, die in den Versuchen dieser Arbeit zum Einsatz kam. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass sich die Fab- und Fc-vermittelten Effektorfunktionen der Wildtypvariante und dem optimierten IgA2.0 *in vitro* nicht unterscheiden.³⁷

Neben dem Austausch von Asparaginen beim IgA2.0-Format wurden IgA-Moleküle mit Albuminresten fusioniert oder Tandemmoleküle, bestehend aus einem IgG- und einem IgA-Fc-Teil, generiert, um die Halbwertszeit zu verlängern. Hierbei wird sich der Recyclingprozess über die Bindung von IgG oder Albumin an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zu Nutze gemacht.^{245,255,256}

Eine Aktivierung des Fc α -Rezeptors kann auch über die Bindung des Fab-Teils eines Antikörpers erfolgen. Somit lassen sich beispielsweise bispezifische Antikörper im IgG-Format generieren, die jeweils mit einem Arm monovalent sowohl das Tumorantigen als auch CD89 binden.^{67,257,258} Durch die Verwendung eines HER2xCD89 bispezifischen Antikörpers wird die Polarisation von tumorassoziierten Makrophagen in Richtung antitumorale M1-Makrophagen gesteuert und es kommt zu einer verstärkten Antigenpräsentation, wie in aktuellen *in vivo*-Experimenten gezeigt werden konnte.²⁵⁹

Eine weitere Hürde zum klinischen Einsatz von IgA-Molekülen ist die Produktion und Isolation. Während IgG-Antikörper mit Protein A isoliert werden können²⁶⁰, kommt diese Methode bei IgA-Molekülen, obwohl Protein A an die VH3 Domäne vom IgA zu binden scheint²⁶¹, industriell nicht zum Einsatz.

Die Bindung der kappa (sofern vorliegend) leichten Kette stellt eine alternative Methode zur IgA-Isolierung dar. Bei Wildtypvarianten der IgA2-Immunglobuline, genauer gesagt der IgA2m(1)-Antikörper (Ursprungstyp der hier eingesetzten IgA2-Moleküle), sind die leichten Ketten nicht kovalent mit den schweren Ketten verbunden.²⁶² Dies hat zur Folge, dass neben den assemblierten Antikörpern auch viele freie leichte Ketten gebunden werden und somit die eingesetzten Isolationsagenzien schneller abgesättigt sind. Durch die Mutation P221R in einer IgA2m(1)-Variante konnte die Ausbildung kovalenter Interaktionen der leichten und schweren Kette begünstigt²⁶³ und somit die Ausbeute als auch die Stabilität erhöht werden. Neben den in dieser Arbeit verwendeten IgA2-Molekülen gegen EGFR und CD38 wurden mittlerweile IgA2-Antikörper gegen zahlreiche andere Oberflächenantigene wie CD20, CD19 und HLA DR im Labor generiert (Publikation in Bearbeitung). Die Produktion findet dabei fast ausschließlich in CHO-S-Zellen nach transienter Transfektion statt mit anschließender Isolation über kommerziell erhältliche Sepharoseteilchen, die dank beladener Ein-Domänen-Antikörperfragmente die CH1-Domäne von IgA-Molekülen binden. Die Möglichkeit einer effizienten und schnellen Produktion sowie Isolation von IgA-Molekülen ist somit geschaffen.

4.2 Einfluss der CD47-SIRP α -Interaktionsblockade auf die Aktivierung von myeloischen Zellen in der antikörperbasierten Tumormimmuntherapie

Die Einführung der Blockade von Immuncheckpoints revolutionierte die Tumormimmuntherapie. Hierbei werden vor allem T-Zellen unter Verwendung monoklonaler Antikörper wie Ipilimumab (anti-CTLA-4), Nivolumab (anti-PD-1), Pembrolizumab (anti-PD-1) und Atezolizumab (anti-PD-L1 auf Tumorzellen) aktiviert.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Eine Immuncheckpoint-Blockade zur spezifischen Aktivierung myeloischer Zellen ist derzeit Bestandteil klinischer Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD47-SIRP α -Interaktion indirekt über die Inhibition der Isoglutaminylyklase sowie direkt mit einem CD47-gerichteten Antikörper blockiert und in Kombination mit therapeutischen Antikörpern hinsichtlich der Antitumoraktivität untersucht.

4.2.1 Die Inhibition der Isoglutaminylyklase

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Isoglutaminylyklaseinhibitors SEN177 die antikörperabhängige Tumorzelllyse bzw. Phagozytose von EGFR-positiven Karzinomzellen gesteigert werden konnte. Dabei wurde beobachtet, dass mit Neutrophilen insbesondere Panitumumab und Cetuximab-IgA2 von der zusätzlichen Isoglutaminylyklaseinhibition profitierten (ca. 33 % Anstieg). Mit Makrophagen ließ sich die Phagozytose mit allen drei eingesetzten monoklonalen Antikörpern (Cetuximab, Panitumumab und Cetuximab-IgA2) um das Zwei-Fache steigern.

Initiale Experimente von Logtenberg et al. zeigten, dass eine genetische Ablation der Isoglutaminylyklase die antikörpervermittelte Eliminierung von murinen Ba/F3-Zellen, die transgen für humanes HER2 waren, *in vivo* unter Verwendung eines anti-HER2 IgA1-Antikörpers signifikant zur Kontrolle erhöhte.¹⁹⁵ Die QPCTL Knock-Out-Zellen konnten dabei genauso effektiv eliminiert werden wie Tumorzellen, die kein CD47 mehr aufwiesen.¹⁹⁵ Gleichzeitig arbeiteten Wu et al. ebenfalls an der Untersuchung des Einflusses der Isoglutaminylyklase auf die CD47-SIRP α -Interaktion und dessen Wirkung in der antikörperbasierten Tumorzelleliminierung. Sie fanden heraus, dass humane kolorektale Karzinomzellen dabei stärker von Makrophagen phagozytiert wurden, wenn keine QPCTL vorliegt oder diese inhibiert wird.¹⁹⁶

Nicht nur solide sondern auch humane hämatologische Tumorzellen, in diesem Falle T-ALL-Zellen, lassen sich weitaus besser durch Makrophagen in Daratumumab-vermittelten ADCP-Versuchen *in vitro* eliminieren, sobald die QPCTL inhibiert ist.²³⁵

Makrophagen profitieren womöglich stärker als Neutrophile von einer Inhibition der QPCTL in Tumorzellen. Diese Beobachtung konnte zumindest bei den in dieser Arbeit verwendeten MOLT-13 Knock-Out-Mutanten gemacht werden.

Die Phagozytose der Mutanten war genauso effektiv wie die von Zellen mit kompletter Ablation des CD47-Moleküls. In der Neutrophilen-vermittelten Zellyse reichte ein QPCTL Knock-Out hingegen nicht aus, um maximale Lyseraten, wie sie bei CD47 Knock-Out-Zellen gesehen wurden, zu generieren. Durch die Bindungsexperimente mit dem nativen CD47-Fusionsprotein huCD47-wt-Fc wird diese Theorie gestützt. Das CD47-Fusionsprotein bindet stärker an Makrophagen als an Neutrophile und Makrophagen exprimieren auch in stärkerem Maße das SIRP α -Molekül verglichen mit Neutrophilen. Eine Inhibition der QPCTL könnte folglich wesentlich mehr negative ITIM-Signale des SIRP α in Makrophagen (aufgrund der höheren SIRP α -Dichte) aufheben als dies bei Neutrophilen der Fall wäre.

Die in dieser Arbeit genierten Daten zeigen, dass SEN177 ein effektiver QPCTL-Inhibitor ist. Obwohl nach QPCTL-Inhibition noch eine Restbindung des SIRP α -Fusionsproteins vorlag, scheint diese auf die erhöhte Affinität des gereiften SIRP α -Fusionsproteins²²⁶ gegenüber CD47 zurückzuführen zu sein und nicht auf die Effektivität des Inhibitors. Eine Restbindung des SIRP α -Fusionsproteins an MOLT-13-Zellen mit komplettem Knock-Out der Isoglutaminylzyklase ist ein weiteres Indiz für die erhöhte Affinität, die den Wegfall der Pyroglutamatformation am CD47 N-Terminus tolerieren kann. Unter Verwendung der nativen SIRP α -Ektodomäne fand kaum eine Bindung an die Pyroglutamat-defiziente Variante des CD47-Fusionsproteins im ELISA statt.

Obwohl SEN177 eine hohe Effektivität *in vitro* zeigt, eignet sich der Inhibitor aufgrund seiner Toxizität im lebenden Organismus nicht für den Einsatz im Menschen oder für längere präklinische Behandlungsstudien. Aus diesem Grund wurden die Tumorzellen in dem durchgeführten *in vivo*-Versuch vorbehandelt und ein Kurzzeitmodell gewählt, um einer Wiederherstellung des Pyroglutamats vorzubeugen. Die Daten lassen darauf schließen, dass eine QPCTL-Inhibition den Effekt einer antikörperbasierten Tumormimmuntherapie ebenfalls *in vivo* verstärken kann, sofern eine ausreichend große Versuchstierpopulation vorliegt.

In davon unabhängigen *in vivo*-Studien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass ein Knock-Out der QPCTL zu einer Remodelierung des Tumormilieus führt, bei der weniger myeloische Zellen infiltrieren und sich dementsprechend weniger protumorale tumorassoziierte myeloischen Zellen ausbilden.^{264,265} Durch den QPCTL Knock-Out wurde die Ausbildung des Pyroglutamats an den Chemokinen CCL2 und CCL7 verhindert, wodurch die Funktion der Chemokine unterbunden wurde.²⁶⁴

Dass eine Ablation der QPCTL auch *in vivo* zu einer Modifikation von CD47 führt, wurde an QPCTL Knock-Out-Mäusen gezeigt.²⁶⁶ Ebenfalls wichtig zu erwähnen ist, dass die Deletion des QPCTL-Gens generell keinen Einfluss auf die physiologische Aktivität des Immunsystems in den Mäusen hatte.²⁶⁶

Für einen klinischen Einsatz wird an weiteren Inhibitoren der Isoglutaminyklyase geforscht, die eine hohe Effektivität und gleichzeitig eine niedrige Toxizität aufweisen sollen.

Das am weitesten in klinischen Studien getestete Molekül ist PQ912 (Varoglutamstat), das primär in der Alzheimertherapie eingesetzt werden soll.²⁶⁷ Aufgrund der vielversprechenden Resultate des Glutaminyklyaseinhibitors wurde 2021 der *Fast-Track*-Status von der FDA erteilt, um den Wirkstoff schnellstmöglich den Patienten zur Verfügung zu stellen.²⁶⁸ PQ912 ist demnach ein potentieller Kandidat zur Untersuchung der CD47-SIRP α -Interaktionsblockade in der Tumormimmuntherapie und sollte in zukünftigen Studien SEN177 substituieren, vor allem in Hinblick auf das im Vergleich zu SEN177 verbesserte Sicherheitsprofil. Abschließend lässt sich sagen, dass die Isoglutaminyklyase eine interessante Zielstruktur in der Tumortherapie ist, da sie nicht nur in diversen Tumorentitäten überexprimiert wird, sondern die Überexpression auch mit einem schlechteren Gesamtüberleben, z. B. bei der akuten myeloischen Leukämie, korreliert.¹⁹⁶

4.2.2 CD47-SIRP α -Blockade mit CD47-Antikörpern

Unter Verwendung des CD47-Blockadeantikörpers hu5F9-IgG2 σ konnte die antikörpervermittelte Eliminierung von T-ALL-Zellen verbessert werden. Die Phagozytose der Zelllinien HSB-2, MOLT-13 und P12-ICHIKAWA wurde durch den kombinatorischen Einsatz von CD38-gerichteten Antikörpern und dem CD47-Blockadeantikörper im Vergleich zu den Daratumumab-Varianten alleine gesteigert. Dabei waren beide Daratumumab-Isotypen, sowohl IgG1 als auch IgA2, gleich gut in der Tumorzelleliminierung. Als IgA2 führte Daratumumab in Kombination mit dem CD47-Blockadeantikörper ebenfalls zu einer effektiven Phagozytose von Patientenzellen. Da hier jedoch nur wenige Daten generiert werden konnten, müssen zusätzliche Versuche mit weiteren Patientenproben die Ergebnisse validieren.

Bei der Neutrophilen-vermittelten Tumorzelllyse der T-ALL-Zelllinien war die Kombination aus DARA (IgG1) und CD47-Blockade nur gegen P12-ICHIKAWA-Zellen effektiv. Lediglich DARA-IgA2 plus hu5F9-IgG2 σ war in der Lage eine spezifische Tumorzelllyse der drei T-ALL-Zelllinien zu induzieren. Dies zeigt erneut, wie effektiv IgA-Antikörper in der Tumormimmuntherapie sind und zusätzlich zum IgG1-Isotyp eingesetzt werden sollten. Neben der Erhöhung einer T-ALL-Zelleliminierung durch hu5F9-IgG2 σ ist jedoch allgemein die Funktionalität von Daratumumab-Varianten gegenüber T-ALL-Zellen ein großer Erfolg, da bis dato noch kein Antikörper für einen immuntherapeutischen Einsatz bei der T-ALL in Europa und den USA zugelassen ist.

Die Kombination aus therapeutischen Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene mit CD47-Blockadeantikörpern konnte auch in diversen aktuellen präklinischen Studien Erfolge erzielen. Zusammen mit dem CD47-Blockadeantikörper hu5F9-IgG2 σ konnte Daratumumab die Eliminierung von T-ALL-Patientenzellen in einem PDX- (engl. *patient derived xenograph*) Mausmodell signifikant zur Monotherapie verbessern.²³⁵ Die Verwendung der CD20-gerichteten Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab, sowohl als IgG1 als auch IgA2, in Kombination mit dem CD47-Blockadeantikörper hu5F9-IgG2 σ führte zu einer verbesserten Phagozytose von B-Lymphomzellen durch Makrophagen. Zusätzlich waren vor allem die IgA2-Varianten in der Lage Neutrophile zu aktivieren.⁷⁶

Unabhängig davon wurde bereits 2010 durch Chao et al. bekannt, dass Rituximab in Kombination mit einem CD47-Blockadeantikörper erfolgreich die Phagozytose von B-NHL-Zellen induziert.²⁶⁹ Auch Mammakarzinomzellen konnten effektiv unter Einsatz des HER2-gerichteten Antikörpers Trastuzumab zusammen mit dem CD47-Blockadeantikörper Magrolimab (hu5F9-IgG4) *in vitro* durch Makrophagen eliminiert werden. Diese Kombination führte zudem zu einem verlängerten Überleben von xenotransplantierten NSG-Mäusen.²⁷⁰ Die Rituximab-vermittelte Phagozytose von Lymphomzellen konnte durch die Blockade der zwei myeloischen Checkpoints CD47 und LILRB1 erhöht werden.²⁷¹

Das Potential von CD47-Blockadeantikörpern konnte bereits in klinischen Studien beobachtet werden. Unter den CD47-Blockadereagenzien ist die Entwicklung des CD47-Antikörpers Magrolimab am fortgeschrittensten.

In einer klinischen Studie der Phase 1b erzielte die Kombination aus Magrolimab und Rituximab vielversprechende Resultate: die Hälfte der 22 rekrutierten Patienten mit einem rezidivierten oder refraktären non-Hodgkin-Lymphom, die nicht mehr auf Rituximab ansprachen, zeigte ein partiales oder vollständiges Ansprechen auf die Kombinationstherapie. Lediglich moderate Nebenwirkungen (meist Grad 1 bzw. 2), vor allem eine Anämie und Infusionsreaktionen, wurden beobachtet.²¹⁷

Neuste Ergebnisse aus einer klinischen Phase 1b-Studie ließen erkennen, dass die Kombination aus Magrolimab und dem synthetischen Nukleosid Azacitidin ein Ansprechverhalten von ca. 50 % (partial oder vollständig) bei Patienten mit TP53-mutierter akuter myeloischer Leukämie, die sich nicht für eine Chemotherapie eignen, generierte. Schwerwiegendere Nebenwirkungen des Grades 3 bzw. 4 waren unter anderem Anämie, febrile Neutropenie und Thrombozytopenie.²¹⁹

Zudem laufen derzeit weitere klinische Studien bzw. sind in Planung, die die Verwendung von Magrolimab mit beispielsweise dem VEGF-Antikörper Bevacizumab bei Patienten mit fortgeschrittenem metastasierendem kolorektalen Karzinom²⁷², mit Daratumumab bei Patienten mit Multiplem Myelom²⁷³ oder mit Pembrolizumab bei Patienten mit rezidivierten oder refraktären Hodgkin-Lymphomen²⁷⁴, untersuchen.

Da CD47 ein ubiquitär exprimiertes Oberflächenmolekül ist, sind Nebenwirkungen wie eine Anämie oder Thrombozytopenie bei einem Einsatz von CD47-Blockadeantikörpern wie Magrolimab nicht auszuschließen. Zusätzlich führen diese *off-tumor*-Aktivitäten möglicherweise dazu, dass vermehrte Applikationen oder höhere Dosierungen notwendig sind, da der therapeutische Effekt durch das Abfangen der Blockadeantikörper gemindert werden kann. Um diese Problematik zu beheben bedarf es einer Optimierung der Tumorspezifität solcher CD47-Blockadeantikörper.

Eine Möglichkeit könnte hierbei die Entwicklung bispezifischer Antikörper sein, die beispielsweise monovalent über einen Arm eine hohe Affinität zu einem tumorassoziierten Antigen aufweisen und zusätzlich mit einer niedrigeren Affinität über den zweiten Arm das CD47 der Tumorzelle blockieren.

Präklinische Studien konnten bereits zeigen, dass ein bispezifischer Antikörper, der sowohl gegen CD20 als auch gegen CD47 gerichtet ist, genauso effektiv eine Eliminierung von Lymphomzellen durch Makrophagen induziert wie die Kombination aus Rituximab und CD47-Antikörper, jedoch interessanterweise keine Bindung an Erythrozyten in einer Co-Kultur aufzeigte.²⁷⁵ Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen eines CD19xCD47 bispezifischen Antikörpers gegen B-Zell-Neoplasien erzielt.²⁷⁶ Hierbei zeigte sich außerdem, dass auch *in vivo* die Tumorlast genauso effizient herabgesenkt werden konnte wie mit der Kombination aus einem CD19- und einem CD47-Antikörper.²⁷⁶ Zudem wird an sogenannten Ein-Domänen-Antikörpern (engl. *nanobodies*) ohne Fc-Teil geforscht, die spezifisch CD47 binden und keine Agglutination von Erythrozyten hervorrufen.²⁷⁷

Eine *off-target*-Toxizität gegen beispielsweise Erythrozyten ist höchstwahrscheinlich auf einen funktionalen Fc-Teil des Antikörpers zurückzuführen, durch den eine Aktivierung von Effektorzellen resultiert. Die Fusion eines humanen IgG4-Fc-Teils an affinitätsgereifte SIRP α -Ektodomänen führte zu einem drastischen Anstieg der Phagozytose im Vergleich zu den SIRP α -Ektodomänen alleine.²⁷⁸

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass ein CD47-Blockadeantikörper mit nicht-funktionalem Fc-Teil alleine weder eine spezifische Tumorzelllyse noch Phagozytose der T-ALL-Zellen induzierte und somit eine geringere Toxizität im lebenden Organismus aufweisen könnte. Obwohl Magrolimab in einem humanen IgG4-Format konzipiert wurde, um die Interaktion zwischen Fc γ -Rezeptoren und dem Antikörper zu minimieren, wäre die Verwendung eines CD47-Blockadeantikörpers mit einem mutierten Fc-Teil, der keine Fc-Rezeptorbindung²²⁵ aufweist, womöglich von Vorteil.

Abschließend lässt sich sagen, dass die CD47-Überexpression bei einer Vielzahl an Tumorerkrankungen mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist²⁷⁹⁻²⁸³ und dementsprechend eine optimale Zielstruktur in der Tumorthherapie darstellt.

4.2.3 Steigerung der Antigendichte mit ATRA verbessert die antikörperbasierte Tumorzelllyse und Phagozytose

Dass die Antigendichte einen Einfluss auf die Tumorzelleliminierung, insbesondere bei der Neutrophilen-vermittelten ADCC, haben kann, zeigte sich bei den T-ALL-Zelllinien: während HSB-2-Zellen mit der geringsten CD38-Expression nicht lysiert werden konnten, ließen sich MOLT-13-Zellen mit einer schwachen CD38 Expression zu 5 % lysieren und die P12-ICHIKAWA-Zellen mit der höchsten CD38-Expression bis zu 22 %.

Diese Beobachtung wurde auch bei Karzinomzelllinien gemacht. Hier erfuhr die Tumorzelllinie A431 mit der höchsten EGFR-Expression die stärkste CTX-IgA2-vermittelte Lyse, Kyse-30-Zellen mit intermediärer EGFR-Expression die zweithöchste Lyserate und MDA-MB-468-Zellen mit der geringsten EGFR-Expression ebenfalls die geringste Lyserate.

Publizierte Daten konnten bereits zeigen, dass die EGFR-Expression mit der Tumorzelleliminierung durch NK-Zellen, Monozyten, Neutrophile und das Komplementsystem positiv korreliert²⁸⁴, so dass die hier generierten Ergebnisse die unabhängigen Beobachtungen bestätigen. Die Behandlung der T-ALL-Zelllinie HSB-2 mit dem Vitamin A-Derivat ATRA führte zu einem drastischen Anstieg der CD38-Expression (25-Facher Anstieg im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen). Die erhöhte CD38-Expression resultierte in einem Anstieg der Daratumumab-induzierten Tumorzelleliminierung. Dies konnte sowohl in der Makrophagen-vermittelten Phagozytose als auch in ADCC-Versuchen mit Neutrophilen beobachtet werden. Weitere Versuche mit T-ALL-Zelllinien mit unterschiedlicher CD38-Expression müssen jedoch noch zeigen, ob eine positive Korrelation zwischen der CD38-Antigendichte und der Tumorzelleliminierung vorliegt. Zukünftige Versuche müssen zudem zeigen, ob eine ATRA-Behandlung per se zu einem Anstieg der CD38-Expression bei T-ALL-Zellen führt und sich somit für einen potenziellen Einsatz in der Immuntherapie der T-ALL eignet.

Im Gegensatz zu den Glutaminylzyklaseinhibitoren oder den CD47-Blockadeantikörpern ist ATRA ein bereits zugelassenes Therapeutikum, das zur Behandlung der akuten Promyelozytenleukämie (APL) zum Einsatz kommt. In der Tumorthherapie fördert ATRA die Ausdifferenzierung von malignen Promyelozyten und zeigt vor allem mit einer Dosierung von 45 mg/m²/Tag ein hohes Gesamtüberleben.²⁸⁵ In Kombination mit Daratumumab konnte eine ATRA-Behandlung in präklinischen Studien die Eliminierung von Myelomzellen steigern, wobei ATRA auch hier zu einem Anstieg der CD38-Expression auf den Tumorzellen führte.²³⁷

In einer darauffolgenden klinischen Phase 1/2-Studie mit rezidivierten/refraktären Myelompatienten erzielte die Kombination leider keine vielversprechenden Ergebnisse (Gesamtansprechverhalten: 5 %), jedoch wurde bei 66 % der Patienten ein stabiler Erkrankungszustand erreicht und die ATRA-Gabe führte zu keinen gravierenden Nebenwirkungen.²⁸⁶

Dass ATRA einen direkten zytotoxischen Effekt hat und ein Absterben von Zellen begünstigt, wurde auch im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Unter Verwendung von Kontrollantikörpern konnte keine spezifische Phagozytose bzw. Tumorzelllyse der T-ALL-Zellen nach ATRA-Behandlung verzeichnet werden.

In der klinischen Studie wurde zudem beschrieben, dass ATRA zu einer temporären Erhöhung der CD38-Expression auf Immunzellen führte, wobei hier Monozyten, NK-Zellen und Neutrophile betroffen sein können.^{102,286} Durch die Erhöhung der CD38-Expression auf sämtlichen zirkulierenden Immunzellen und auf den Tumorzellen könnte eine große Anzahl an Daratumumab-Molekülen abgefangen werden und somit die Effektivität beeinträchtigen.

Möglicherweise hätte eine zusätzliche CD47-Blockade das Ansprechverhalten in der klinischen Studie mit Myelompatienten²⁸⁶ verbessert, da myeloische Zellen durch eine zusätzliche CD47-Blockade stärker aktiviert vorliegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kombination bestehend aus einer ATRA-Behandlung, Daratumumab als therapeutischem Antikörper (IgG1 oder IgA2) und einem CD47-Blockadeantikörper die stärkste Lyse bzw. Phagozytose von HSB-2-Zellen durch myeloische Zellen induziert.

Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da aktivierende Signale durch die gesteigerte CD38-Expression erhöht und inhibierende Signale über die CD47-Blockade verringert wurden. Für die Phagozytose muss ein Verhältnis von mindestens 10:1 zwischen aktivierenden ITAM-Signalen (vermittelt über die Fc-Rezeptor gebundenen Antikörper) und inhibierenden ITIM-Signalen der CD47-SIRP α -Interaktion auf Makrophagen vorliegen.²⁸⁷ Auch hier sollten wiederum Versuche mit weiteren T-ALL-Zelllinien als auch zukünftige *in vivo*-Studien die initialen Ergebnisse validieren um zu zeigen, dass die Kombination von ATRA mit Daratumumab und CD47-Blockadeantikörper eine effektive Strategie zur Bekämpfung der T-ALL darstellt.

4.2.4 Vergleich der methodischen Ansätze zur CD47-SIRP α -Interaktionsblockade

Sowohl die indirekte CD47-SIRP α -Interaktionsblockade durch die Inhibition der Isoglutaminylyklase als auch die direkte Blockade über den Einsatz von CD47-Antikörpern erzielte im Rahmen dieser Arbeit einen Anstieg der antikörperabhängigen Tumorzellphagozytose bzw. Tumorzelllyse durch Makrophagen und Neutrophile. Für einen möglichen klinischen Einsatz spielen jedoch neben der rein funktionalen Evaluation der CD47-Blockadereagenzien weitere Faktoren wie die Produktion der Substanzen, die Applikation und Dosis, die biologische Verfügbarkeit bis hin zu potentiellen Nebenwirkungen eine wichtige Rolle.

Während Isoglutaminylyklaseinhibitoren als niedermolekulare organische Verbindungen leicht und kostengünstig über automatisierte Prozesse synthetisch hergestellt werden können²⁸⁸, ist die Produktion von Antikörpern weitaus kosten- und zeitintensiver. Biologische Systeme wie Produktionszelllinien müssen herangezogen werden, um die Komplexität und die Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen der Antikörper gewährleisten zu können.²⁰

Nach erfolgreicher Herstellung der Therapeutika können diese anschließend unterschiedlich dem Patienten verabreicht werden. In Bezug auf die synthetischen Isoglutaminylyklaseinhibitoren bietet sich eine orale Applikation an. Im Gegensatz dazu erfolgt die Verabreichung von therapeutischen Antikörpern systemisch über die intravenöse oder subkutane Injektion. Dies hat zur Folge, dass ein erhöhtes Risiko für Infusionsreaktionen vorliegt.

Im Körper müssen die Substanzen letztendlich an den Wirkort transportiert werden. Für die Bekämpfung von hämatologischen Erkrankungen, wie der in dieser Arbeit untersuchten T-ALL, bieten sich antikörperbasierte Therapien an, da diese direkt am Wirkort nach Gabe zur Verfügung stehen und z. B. Neutrophile als myeloische Effektorzellen sofort stärker aktiviert werden können.

Weitaus komplizierter gestaltet sich die biologische Verfügbarkeit von Antikörpern bei soliden Tumoren, da zunächst die endotheliale Barriere überwunden werden muss, um in das betroffene Gewebe zu gelangen.^{289,290} Hier haben niedermolekulare Verbindungen wie die Isoglutaminylyklaseinhibitoren den möglichen Vorteil leichter an und in die Zellen des Tumors zu gelangen.

Speziell im Bereich der lokal schwer erreichbaren Tumore im Gehirn wie Gliome, kann die Blut-Hirn-Schranke nur bedingt von Antikörpern überwunden werden. Auch hier ist der Einsatz von kleinen Molekülen von Vorteil.

Am Wirkungsort angekommen sollten die Therapeutika eine hohe Effektivität mit möglichst geringen Nebenwirkungen aufzeigen. In Bezug auf die CD47-Blockadeantikörper wie Magrolimab wurde ersichtlich, dass trotz vielversprechender Resultate häufig eine Anämie als Nebenwirkung auftritt. Diese *off-target*-Aktivität wäre bei der Verwendung von Isoglutaminylzyklaseinhibitoren weitaus geringer, da Erythrozyten ein limitiertes Proteom und keine Organellen wie einen Nukleus, ein Endoplasmatisches Retikulum oder einen Golgi-Apparat, in dem die QPCTL lokalisiert ist, besitzen.²⁹¹ Somit existieren auf den Erythrozyten lediglich die bereits vorliegenden, nativen CD47-Moleküle mit N-ständigem Pyroglutamat, die mit myeloischen Immunzellen interagieren können. Ein weiterer Vorteil für die Verwendung von Isoglutaminylzyklaseinhibitoren bei soliden Tumoren ist die Remodulierung der tumorassoziierten myeloischen Zellen hin zu einer antitumoralen Polarisierung im Tumormilieu. Zudem wurde in der Arbeit ersichtlich, dass die Gesamtexpression von CD47 nach Behandlung der Zellen mit SEN177 nicht beeinträchtigt ist und somit weitere physiologische Interaktionen des Moleküls mit z. B. Thrombospondin-1 oder Integrinen aufrechterhalten werden könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine QPCTL-Inhibition bei soliden Tumoren vielversprechende Ergebnisse erzielen könnte und dementsprechend weiter in klinischen Studien verfolgt werden sollte. In Bezug auf hämatoonkologische Erkrankungen wie Leukämien ist die Verwendung von CD47-gerichteten Blockadeantikörpern eine gute Möglichkeit, um schnell und effizient die antitumoralen Effekte myeloischer Zellen in der Tumorimmuntherapie zu steigern. Jedoch sollten hierbei die Nebenwirkungen berücksichtigt werden. Um das Risiko einer Anämie herabzusenken, könnten alternativ zu einer Kombination von CD47-Blockadeantikörper und tumorspezifischem Antikörper bispezifische Moleküle eingesetzt werden, die die tumorspezifischen Oberflächenzielstrukturen erkennen und nur umliegende CD47-Moleküle auf der Tumorzelle blockieren.

4.3 Zukünftige Vorhaben

Die generierten Daten zeigen das Potential einer CD47-SIRP α -Interaktionsblockade in der antikörperbasierten Tumormimmuntherapie. Bei der indirekten Blockade über eine Inhibition der Isoglutaminylyklase wurden durch die Verwendung der niedermolekularen Substanz SEN177 bei soliden Tumorzellen vielversprechende Ergebnisse erzielt.

SEN177 wird jedoch aufgrund der Toxizität im Organismus keinen Einsatz im Menschen erfahren. Als Alternative könnte beispielsweise PQ912 als Inhibitor verwendet werden, da die Substanz bereits in klinischen Studien getestet wird, ein gutes Sicherheitsprofil zeigt und mittlerweile kommerziell erhältlich ist. Zudem kann unter Verwendung von PQ912 ein Langzeitmodell für *in vivo*-Studien gewählt werden. Vor oraler Applikation des Inhibitors sollte zunächst ein solider Tumor anwachsen, so dass realitätsnahe Bedingungen geschaffen werden. Des Weiteren lässt sich anhand eines Langzeitmodells der Einfluss einer potenziellen Remodellierung des Tumormikromilieus, hervorgerufen durch die Isoglutaminylyklaseinhibition, analysieren.

Als Modellorganismus sollte ebenfalls die für den humanen Fc α R transgene Mauslinie herangezogen werden, um die Kombination aus Isoglutaminylyklaseinhibitor und humanen IgA-Molekülen untersuchen zu können.

In Hinblick auf die direkte Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion müssen auch hier *in vivo*-Experimente in Fc α R transgenen Mäusen das Potential der Daratumumab-Varianten (vor allem DARA-IgA2) in Kombination mit dem CD47-Antikörper bestätigen. Des Weiteren wäre ein direkter Vergleich diverser Moleküle zur CD47-SIRP α -Interaktionsblockade wie SIRP α -Fc-Fusionsproteine, SIRP α -Antikörper, neuartige Blockadepeptide und CD47-Antikörper untereinander jeweils in Kombination mit therapeutischen Antikörpern auf unterschiedlichen Tumorentitäten interessant. Somit könnte die bestmögliche Therapiestrategie gewährleistet werden.

Zusätzlich ist die Evaluierung des Einflusses einer ATRA-Behandlung hoch interessant. Da der positive Effekt bei der Tumorzelleliminierung nur auf einer Zelllinie analysiert wurde, muss in einem ersten Schritt die Testung weiterer Zelllinien und idealerweise die Translation auf Patientenproben das Ergebnis validieren.

Sollte sich ein positiver Effekt bestätigen, kann auch hier das Potenzial der Kombination aus ATRA-Behandlung, Daratumumab (IgG1 bzw. IgA2) und CD47-Blockadeantikörper in zukünftigen *in vivo*-Studien untersucht werden.

Insgesamt ist die myeloische Checkpoint-Inhibition über eine CD47- oder SIRP α -Blockade eine gute Strategie, um myeloische Zellen zu aktivieren und kann möglicherweise zu einer verbesserten Bekämpfung von Tumorerkrankungen in der antikörperbasierten Tumourimmuntherapie führen.

5. Zusammenfassung

Krebserkrankungen konnten erstmals mit der Zulassung von tumorgerichteten Antikörpern zielgerichtet bekämpft werden.

Angefangen mit dem CD20-gerichteten Antikörper Rituximab im Jahr 1997 sind mittlerweile mehr als vierzig Antikörperprodukte für die Therapie diverser maligner Erkrankungen in der Anwendung. Einige davon, wie der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab, richten sich dabei speziell gegen sogenannte Immuncheckpoint-Moleküle. Dies sind Oberflächenantigene auf Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen oder Neutrophilen, die nach Bindung ihrer Liganden ein inhibitorisches Signal in die Immunzelle leiten, so dass die interagierende Zelle als körpereigen erkannt und nicht angegriffen wird.

Je nach Immunzellpopulation existieren unterschiedliche immunregulatorische Oberflächenmoleküle. Bei den myeloischen Zellen ist der prominenteste Vertreter das *signal regulatory protein alpha*, kurz SIRP α . Es interagiert mit seinem Liganden CD47, das nahezu alle Körperzellen exprimieren. Da die Interaktion vor allem mit Phagozyten wie Makrophagen oder Neutrophilen stattfindet, ist das Signal auch als *don't eat me*-Signal beschrieben.

Viele Tumorzellen machen sich diesen Mechanismus zu Nutze und überexprimieren die Liganden wie CD47, um einer Immunantwort zu entkommen. Eine Blockade der CD47-SIRP α -Achse über beispielsweise CD47-gerichtete Antikörper kann somit entscheidend zur Abtötung von Tumorzellen beitragen.

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass der Einsatz des CD47-Blockadeantikörpers hu5F9-IgG2 σ die Eliminierung von Zellen der akuten lymphoblastischen T-Zellleukämie (T-ALL-Zellen) durch Varianten des CD38-gerichteten Antikörpers Daratumumab (IgG1 und IgA2) sowohl in Makrophagen-vermittelten ADCP-Experimenten als auch in Neutrophilen-vermittelten ADCC-Versuchen verstärkt. Dabei stellte sich die Kombination der IgA2-Variante mit dem CD47-Blockadeantikörper als besonders effektiv heraus. Zudem konnte die Makrophagen- und Neutrophilen-vermittelte Phagozytose bzw. Lyse einer T-ALL-Zelllinie mit geringer CD38-Expression durch vorangegangene Behandlung mit dem Vitamin A-Derivat Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, ATRA), das einen Anstieg der CD38-Expression bewirkt, verbessert werden.

Neben der direkten Interaktionsblockade kann die CD47-SIRP α -Achse auch auf indirektem Wege unterbunden werden. Das Golgi-residente Enzym Isoglutaminylyklase ist für die Ausbildung des an der Interaktion zu SIRP α beteiligten Pyroglutamats am N-Terminus des CD47 beteiligt.

Dies konnte im Rahmen der Arbeit durch die Generierung von zwei CD47-Fusionsproteinen bestätigt werden. Während das Fusionsprotein mit nativer CD47-Ektodomäne und N-terminalem Pyroglutamat eine konzentrationsabhängige Bindung an humanes SIRP α zeigte, war ein mit einer Mutation ausgestattetes Fusionsprotein dazu nicht in der Lage.

In funktionalen Experimenten erzielte eine Inhibition der Isoglutaminylyklase mit dem spezifischen Inhibitor SEN177 eine Reduktion der SIRP α -Bindung an Karzinomzellen, die in einer verbesserten, Antikörper-vermittelten Eliminierung der Tumorzellen resultierte. Hierbei wurden die EGFR-gerichteten Antikörper Cetuximab, Panitumumab sowie eine IgA2-Variante des Cetuximab in Makrophagen-ADCP und Neutrophilen-ADCC Versuchen untersucht. Auch bei diesen Experimenten wurde ersichtlich, dass vor allem die Kombination aus einer SEN177-Behandlung und Cetuximab-IgA2 oder Panitumumab (IgG2) vielversprechende Lyse- bzw. Phagozytoseraten generiert.

Folglich stellt eine Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion über einen direkten Ansatz mit CD47-Blockadeantikörpern oder einer indirekten Methode über die Inhibition der Isoglutaminylyklase interessante Möglichkeiten dar, um die Aktivität von myeloischen Zellen gegen solide als auch hämatologische Tumorzellen zu erhöhen.

6. Summary

Monoclonal antibodies as therapeutics have revolutionized tumor therapy, since they are considered as highly specific.

With Rituximab being the first antibody approved in 1997, more than forty antibodies to treat different types of tumors are used in the clinic today. Some of them, e.g. CTLA-4 targeting antibody ipilimumab, bind and block so-called immune checkpoints. These are inhibitory molecules on the cell surface of immune cells like T cells, NK cells, macrophages or neutrophils and protect the body from developing autoimmunities.

Depending on the immune cell population, different immune checkpoint molecules have been identified. Signal regulatory protein alpha (SIRP α), as the most prominent immune checkpoint on myeloid cells, enables inhibition after binding to its ligand CD47, which is expressed on nearly every cell in the body. Since myeloid cells are phagocytes, the inhibitory signal has also been described as 'don't eat me' signal.

Besides the expression of CD47 on healthy cells, tumor cells often overexpress CD47 to evade immune surveillance. Interruption of the CD47-SIRP α axis, e.g. by directly targeting CD47 using blocking antibodies, might therefore increase tumor cell killing.

In this study we showed that application of CD47 blocking antibody hu5F9-IgG2 σ enhanced daratumumab (IgG1 or IgA2) mediated killing of acute T cell leukemia (T-ALL) cells in macrophage ADCP and neutrophil ADCC experiments. Especially the combination of DARA-IgA2 and hu5F9-IgG2 σ turned out to be most efficient in tumor cell phagocytosis and tumor cell lysis, respectively. Moreover, treatment of T-ALL cells expressing low amounts of CD38 with the vitamin A derivative ATRA led to increased CD38 expression, which in turn heightened tumor cell elimination even further.

On the other hand, indirect approaches to interfere with CD47-SIRP α interactions are currently under investigation. The Golgi-resident enzyme glutaminyl-peptide cyclotransferase like protein (QPCTL) is an important modifier of the CD47-SIRP α axis, since it catalyzes the formation of N-terminal pyro-glutamic acid (pGlu) on CD47. This amino acid derivative is crucially involved in the binding to SIRP α .

Here, we were able to confirm the importance of pGlu for SIRP α binding by generating fusion proteins, containing either native CD47 ectodomain or a mutated version having pGlu substituted by an alanine residue. Furthermore, we could demonstrate that inhibition of QPCTL by the small molecule SEN177 boosted killing of carcinoma cells by myeloid cells *in vitro* and *in vivo* when combined with EGFR-targeting antibodies cetuximab, panitumumab or cetuximab as IgA2. Once again, the IgA2 isotype as well as IgG2 (panitumumab) induced highest phagocytosis and tumor cell lysis rates *in vitro*.

Blocking the CD47-SIRP α axis directly with CD47 blocking antibodies or indirectly by QPCTL inhibition is a promising approach to enhance myeloid cell activation in immuno therapeutic therapies against solid and hematologic malignancies.

7. Literaturverzeichnis

1. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system. *N. Engl. J. Med.* **343**, 108–117 (2000).
2. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3-23 (2010).
3. Mullard, A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 491–495 (2021).
4. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
5. Schroeder, T. J., First, M. R., Mansour, M. E., Hurtubise, P. E., Hariharan, S., Ryckman, F. C., Munda, R., Melvin, D. B., Penn, I. & Ballistreri, W. F. Antimurine antibody formation following OKT3 therapy. *Transplantation* **49**, 48–51 (1990).
6. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 118–129 (2001).
7. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6851–6855 (1984).
8. Foster, R. H. & Wiseman, L. R. Abciximab. An updated review of its use in ischaemic heart disease. *Drugs* **56**, 629–665 (1998).
9. Maloney, D. G., Grillo-López, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. & Levy, R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**, 2188–2195 (1997).
10. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–525 (1986).
11. Waldmann, T. A. & O'Shea, J. The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 507–512 (1998).

12. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
13. Smith, G. P. & Petrenko, V. A. Phage display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410 (1997).
14. Kempeni, J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNF α monoclonal antibody D2E7. *Ann. Rheum. Dis.* **58 Suppl 1**, I70-72 (1999).
15. Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstine, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C. C., Mashayekh, R., Wymore, K. & McCabe, J. G. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* **368**, 856–859 (1994).
16. Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C. M., Abderrahim, H., Kirschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. H., Fukushima, A., Hales, J. F., Klapholz, S., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M. & Jakobovits, A. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat. Genet.* **15**, 146–156 (1997).
17. Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S. & Jakobovits, A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.* **7**, 13–21 (1994).
18. Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., Marrapese, G., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Gambacorta, M., Siena, S. & Bardelli, A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* **6**, 279–286 (2005).
19. Gibson, T. B., Ranganathan, A. & Grothey, A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **6**, 29–31 (2006).

20. Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J. & Wu, H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020).
21. Morell, A., Terry, W. D. & Waldmann, T. A. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J. Clin. Invest.* **49**, 673–680 (1970).
22. Ghetie, V., Hubbard, J. G., Kim, J. K., Tsen, M. F., Lee, Y. & Ward, E. S. Abnormally short serum half-lives of IgG in β 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **26**, 690–696 (1996).
23. Junghans, R. P. & Anderson, C. L. The protection receptor for IgG catabolism is the β 2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5512–5516 (1996).
24. Israel, E. J., Wilsker, D. F., Hayes, K. C., Schoenfeld, D. & Simister, N. E. Increased clearance of IgG in mice that lack β 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* **89**, 573–578 (1996).
25. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–S52 (2010).
26. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S. & Daëron, M. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716–3725 (2009).
27. Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 343–357 (2006).
28. Kerr, M. A. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* **271**, 285–296 (1990).
29. Woof, J. M. & Mestecky, J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Rev.* **206**, 64–82 (2005).
30. Atkin, J. D., Pleass, R. J., Owens, R. J. & Woof, J. M. Mutagenesis of the human IgA1 heavy chain tailpiece that prevents dimer assembly. *J. Immunol.* **157**, 156–159 (1996).
31. Sørensen, V., Rasmussen, I. B., Sundvold, V., Michaelsen, T. E. & Sandlie, I. Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *Int. Immunol.* **12**, 19–27 (2000).

32. Johansen, F. E., Braathen, R. & Brandtzaeg, P. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J. Immunol.* **167**, 5185–5192 (2001).
33. Mantis, N. J., Rol, N. & Corthésy, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* **4**, 603–611 (2011).
34. Stockert, R. J., Kressner, M. S., Collins, J. C., Sternlieb, I. & Morell, A. G. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6229–6231 (1982).
35. Bakema, J. E. & van Egmond, M. The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* **4**, 612–624 (2011).
36. Kretschmer, A., Schwanbeck, R., Valerius, T. & Rösner, T. Antibody isotypes for tumor immunotherapy. *Transfus. Med. Hemother.* **44**, 320–326 (2017).
37. Lohse, S., Meyer, S., Meulenbroek, L. A. P. M., Jansen, J. H. M., Nederend, M., Kretschmer, A., Klausz, K., Möglinger, U., Derer, S., Rösner, T., Kellner, C., Schewe, D., Sondermann, P., Tiwari, S., Kolarich, D., Peipp, M., Leusen, J. H. W. & Valerius, T. An anti-EGFR IgA that displays improved pharmacokinetics and myeloid effector cell engagement in vivo. *Cancer Res.* **76**, 403–417 (2016).
38. Williams, A. F. & Barclay, A. N. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381–405 (1988).
39. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 520 (2014).
40. Chintalacharuvu, K. R., Raines, M. & Morrison, S. L. Divergence of human α -chain constant region gene sequences. A novel recombinant α 2 gene. *J. Immunol.* **152**, 5299–5304 (1994).
41. Furtado, P. B., Whitty, P. W., Robertson, A., Eaton, J. T., Almogren, A., Kerr, M. A., Woof, J. M. & Perkins, S. J. Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J. Mol. Biol.* **338**, 921–941 (2004).

42. Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–287 (2012).
43. Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F. & Ciardiello, F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **158**, 1–9 (2009).
44. Beers, S. A., Chan, C. H. T., French, R. R., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin. Hematol.* **47**, 107–114 (2010).
45. Weiner, G. J. Rituximab: mechanism of action. *Semin. Hematol.* **47**, 115–123 (2010).
46. Alduaij, W., Ivanov, A., Honeychurch, J., Cheadle, E. J., Potluri, S., Lim, S. H., Shimada, K., Chan, C. H. T., Tutt, A., Beers, S. A., Glennie, M. J., Cragg, M. S. & Illidge, T. M. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* **117**, 4519–4529 (2011).
47. Overdijk, M. B., Jansen, J. H. M., Nederend, M., Lammerts van Bueren, J. J., Groen, R. W. J., Parren, P. W. H. I., Leusen, J. H. W. & Boross, P. The therapeutic CD38 monoclonal antibody daratumumab induces programmed cell death via Fcγ receptor-mediated cross-linking. *J. Immunol.* **197**, 807–813 (2016).
48. de Weers, M., Tai, Y.-T., van der Veer, M. S., Bakker, J. M., Vink, T., Jacobs, D. C. H., Oomen, L. A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J. W., Mutis, T., Bleeker, W. K., Anderson, K. C., Lokhorst, H. M., van de Winkel, J. G. J. & Parren, P. W. H. I. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J. Immunol.* **186**, 1840–1848 (2011).
49. Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 317–327 (2010).
50. Dunkelberger, J. R. & Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **20**, 34–50 (2010).

51. Rösner, T., Derer, S., Kellner, C., Dechant, M., Lohse, S., Vidarsson, G., Peipp, M. & Valerius, T. An IgG3 switch variant of rituximab mediates enhanced complement-dependent cytotoxicity against tumour cells with low CD20 expression levels. *Br. J. Haematol.* **161**, 282–286 (2013).
52. Zipfel, P. F. & Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 729–740 (2009).
53. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **96**, 179–204 (2007).
54. Houot, R., Kohrt, H. E., Marabelle, A. & Levy, R. Targeting immune effector cells to promote antibody-induced cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **32**, 510–516 (2011).
55. van Egmond, M. & Bakema, J. E. Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 190–199 (2013).
56. Woof, J. M. & Burton, D. R. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 89–99 (2004).
57. Getahun, A. & Cambier, J. C. Of ITIMs, ITAMs and ITAMis, revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol. Rev.* **268**, 66–73 (2015).
58. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
59. Gül, N. & van Egmond, M. Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res.* **75**, 5008–5013 (2015).
60. Velmurugan, R., Challa, D. K., Ram, S., Ober, R. J. & Ward, E. S. Macrophage-mediated trogocytosis leads to death of antibody-opsonized tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1879–1889 (2016).
61. Matlung, H. L., Babes, L., Zhao, X. W., van Houdt, M., Treffers, L. W., van Rees, D. J., Franke, K., Schornagel, K., Verkuijlen, P., Janssen, H., Halonen, P., Lieftink, C., Beijersbergen, R. L., Leusen, J. H. W., Boelens, J. J., Kuhnle, I., van der Werff Ten Bosch, J., Seeger, K., Rutella, S., Pagliara, D.,

- Matozaki, T., Suzuki, E., Menke-van der Houven van Oordt, C. W., van Bruggen, R., Roos, D., van Lier, R. A. W., Kuijpers, T. W., Kubes, P. & van den Berg, T. K. Neutrophils kill antibody-opsionized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep.* **23**, 3946-3959.e6 (2018).
62. Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunol. Cell Biol.* **71 (Pt 3)**, 201–208 (1993).
63. Ashraf, S. Q., Nicholls, A. M., Wilding, J. L., Ntouroupi, T. G., Mortensen, N. J. & Bodmer, W. F. Direct and immune mediated antibody targeting of ERBB receptors in a colorectal cancer cell-line panel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 21046–21051 (2012).
64. Overdijk, M. B., Verploegen, S., Bögels, M., van Egmond, M., Lammerts van Bueren, J. J., Mutis, T., Groen, R. W. J., Breij, E., Martens, A. C. M., Bleeker, W. K. & Parren, P. W. H. I. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *mAbs* **7**, 311–321 (2015).
65. Bakema, J. E. & van Egmond, M. Fc receptor-dependent mechanisms of monoclonal antibody therapy of cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382**, 373–392 (2014).
66. Rösner, T., Kahle, S., Montenegro, F., Matlung, H. L., Jansen, J. H. M., Evers, M., Beurskens, F., Leusen, J. H. W., van den Berg, T. K. & Valerius, T. Immune effector functions of human IgG2 antibodies against EGFR. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 75–88 (2019).
67. Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriel, A. B., Graziano, R. F., van den Herik-Oudijk, I. E., Repp, R., Deo, Y. M., Lund, J., Kalden, J. R., Gramatzki, M. & van de Winkel, J. G. Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* **90**, 4485–4492 (1997).
68. Dechant, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Weisner, W., Peipp, M., van de Winkel, J. G. J. & Valerius, T. Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J. Immunol.* **179**, 2936–2943 (2007).
69. Boross, P., Lohse, S., Nederend, M., Jansen, J. H. M., van Tetering, G., Dechant, M., Peipp, M., Royle, L., Liew, L. P., Boon, L., van Rooijen, N., Bleeker, W. K., Parren, P. W. H. I., van de Winkel,

- J. G. J., Valerius, T. & Leusen, J. H. W. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1213–1226 (2013).
70. Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S. L. & Chintalacheruvu, K. R. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 Isotypes. *J. Exp. Med.* **191**, 2171–2182 (2000).
71. Rouwendal, G. J., van der Lee, M. M., Meyer, S., Reiding, K. R., Schouten, J., de Roo, G., Egging, D. F., Leusen, J. H., Boross, P., Wuhrer, M., Verheijden, G. F., Dokter, W. H., Timmers, M. & Ubink, R. A comparison of anti-HER2 IgA and IgG1 in vivo efficacy is facilitated by high N-glycan sialylation of the IgA. *mAbs* **8**, 74–86 (2016).
72. Du, F. H., Mills, E. A. & Mao-Draayer, Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Autoimmun. Highlights* **8**,12 (2017).
73. Elsässer, D., Valerius, T., Repp, R., Weiner, G. J., Deo, Y., Kalden, J. R., van de Winkel, J. G., Stevenson, G. T., Glennie, M. J. & Gramatzki, M. HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **87**, 3803–3812 (1996).
74. Lohse, S., Loew, S., Kretschmer, A., Jansen, J. H. M., Meyer, S., Ten Broeke, T., Rösner, T., Dechant, M., Derer, S., Klausz, K., Kellner, C., Schwanbeck, R., French, R. R., Tipton, T. R. W., Cragg, M. S., Schewe, D. M., Peipp, M., Leusen, J. H. W. & Valerius, T. Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. *Br. J. Haematol.* **181**, 413–417 (2018).
75. Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M. J., Gramatzki, M., van De Winkel, J. G. J. & Valerius, T. Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* **100**, 4574–4580 (2002).
76. Evers, M., Rösner, T., Dünkel, A., Jansen, J. H. M., Baumann, N., Ten Broeke, T., Nederend, M., Eichholz, K., Klausz, K., Reiding, K., Schewe, D. M., Kellner, C., Peipp, M., Leusen, J. H. W. &

- Valerius, T. The selection of variable regions affects effector mechanisms of IgA antibodies against CD20. *Blood Adv.* **5**, 3807–3820 (2021).
77. Peipp, M., Lammerts van Bueren, J. J., Schneider-Merck, T., Bleeker, W. W. K., Dechant, M., Beyer, T., Repp, R., van Berkel, P. H. C., Vink, T., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I. & Valerius, T. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood* **112**, 2390–2399 (2008).
78. 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. & Lankester, A. C. Anti-EGFR antibody cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells toward osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 432–441 (2012).
79. Tian, X., Wei, F., Wang, L., Yu, W., Zhang, N., Zhang, X., Han, Y., Yu, J. & Ren, X. Herceptin enhances the antitumor effect of Natural Killer cells on breast cancer cells expressing human epidermal growth factor receptor-2. *Front. Immunol.* **8**, 1426 (2017).
80. Kellner, C., Günther, A., Humpe, A., Repp, R., Klausz, K., Derer, S., Valerius, T., Ritgen, M., Brüggemann, M., van de Winkel, J. G., Parren, P. W., Kneba, M., Gramatzki, M. & Peipp, M. Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *Oncoimmunology* **5**, e1058459 (2016).
81. Kabelitz, D., Serrano, R., Kouakanou, L., Peters, C. & Kalyan, S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 925–939 (2020).
82. Nagorsen, D., Bargou, R., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P. A. & Zugmaier, G. Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab. *Leuk. Lymphoma* **50**, 886–891 (2009).
83. Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D’Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting,

- M., Nippgen, J. & Rougier, P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1408–1417 (2009).
84. Hudis, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **357**, 39–51 (2007).
85. Salles, G., Duell, J., González Barca, E., Tournilhac, O., Jurczak, W., Liberati, A. M., Nagy, Z., Obr, A., Gaidano, G., André, M., Kalakonda, N., Dreyling, M., Weirather, J., Dirnberger-Hertweck, M., Ambarkhane, S., Fingerle-Rowson, G. & Maddocks, K. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **21**, 978–988 (2020).
86. Cang, S., Mukhi, N., Wang, K. & Liu, D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J. Hematol. Oncol.* **5**, 64 (2012).
87. Romero, D. Haematological cancer: Improvements with daratumumab. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 592 (2016).
88. Alinari, L., Lapalombella, R., Andritsos, L., Baiocchi, R. A., Lin, T. S. & Byrd, J. C. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **26**, 3644–3653 (2007).
89. Tissue expression of EGFR - Summary - The Human Protein Atlas.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/tissue>. [Accessed March 31, 2023]
90. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **19**, 183–232 (1995).
91. Mendelsohn, J. & Baselga, J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol.* **33**, 369–385 (2006).
92. Carraway, K. L. & Sweeney, C. EGF receptor activation by heterologous mechanisms. *Cancer Cell* **1**, 405–406 (2002).

93. Sigismund, S., Avanzato, D. & Lanzetti, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol. Oncol.* **12**, 3–20 (2018).
94. Yarden, Y. & Pines, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 553–563 (2012).
95. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J. W., Kussie, P. & Ferguson, K. M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311 (2005).
96. Freeman, D., Sun, J., Bass, R., Jung, K., Ogbagabriel, S., Elliott, G. & Radinsky, R. Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity. *J. Clin. Oncol.* **26**, 14536–14536 (2008).
97. Sickmier, E. A., Kurzeja, R. J. M., Michelsen, K., Vazir, M., Yang, E. & Tasker, A. S. The Panitumumab EGFR complex reveals a binding mechanism that overcomes cetuximab induced resistance. *PLoS One* **11**, e0163366 (2016).
98. Dechant, M., Weisner, W., Berger, S., Peipp, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Bleeker, W. K., Parren, P. W. H. I., van de Winkel, J. G. J. & Valerius, T. Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res.* **68**, 4998–5003 (2008).
99. Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C. & Mendelsohn, J. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **259**, 7755–7760 (1984).
100. Mendelsohn, J. Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy--the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture. *Clin. Cancer Res.* **6**, 747–753 (2000).
101. Peipp, M., Dechant, M. & Valerius, T. Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 436–443 (2008).

102. Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T. & Aydin, S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* **88**, 841–886 (2008).
103. Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M. & Chiorazzi, N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840–1847 (1999).
104. Keyhani, A., Huh, Y. O., Jendiroba, D., Pagliaro, L., Cortez, J., Pierce, S., Pearlman, M., Estey, E., Kantarjian, H. & Freireich, E. J. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk. Res.* **24**, 153–159 (2000).
105. Suzuki, R., Suzumiya, J., Nakamura, S., Aoki, S., Notoya, A., Ozaki, S., Gondo, H., Hino, N., Mori, H., Sugimori, H., Kawa, K., Oshimi, K., & NK-cell Tumor Study Group. Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia* **18**, 763–770 (2004).
106. Marinov, J., Koubek, K. & Starý, J. Immunophenotypic significance of the 'lymphoid' CD38 antigen in myeloid blood malignancies. *Neoplasma* **40**, 355–358 (1993).
107. Parry-Jones, N., Matutes, E., Morilla, R., Brito-Babapulle, V., Wotherspoon, A., Swansbury, G. J. & Catovsky, D. Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *Br. J. Haematol.* **137**, 117–124 (2007).
108. Wang, L., Wang, H., Li, P., Lu, Y., Xia, Z., Huang, H. & Zhang, Y. CD38 expression predicts poor prognosis and might be a potential therapy target in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type. *Ann. Hematol.* **94**, 1381–1388 (2015).
109. Kawano, Y., Kushima, S., Hata, H. & Matsuoka, M. The role of CD38 in multiple myeloma cell biology. *Blood* **138**, 1580 (2021).

110. Kestens, L., Vanham, G., Gigase, P., Young, G., Hannet, I., Vanlangendonck, F., Hulstaert, F. & Bach, B. A. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS* **6**, 793–797 (1992).
111. Ho, H. N., Hultin, L. E., Mitsuyasu, R. T., Matud, J. L., Hausner, M. A., Bockstoce, D., Chou, C. C., O'Rourke, S., Taylor, J. M. & Giorgi, J. V. Circulating HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J. Immunol.* **150**, 3070–3079 (1993).
112. Henriques, A., Silva, I., Inês, L., Souto-Carneiro, M. M., Pais, M. L., Trindade, H., da Silva, J. A. P. & Paiva, A. CD38, CD81 and BAFFR combined expression by transitional B cells distinguishes active from inactive systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Med.* **16**, 227–232 (2016).
113. Sun, L., Adebajo, O. A., Moonga, B. S., Corisdeo, S., Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Arakawa, T., Hakeda, Y., Koval, A., Sodam, B., Bevis, P. J., Moser, A. J., Lai, F. A., Epstein, S., Troen, B. R., Kumegawa, M. & Zaidi, M. CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* **146**, 1161–1172 (1999).
114. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L. & Mehta, K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol. Today* **15**, 95–97 (1994).
115. Prasad, G. S., McRee, D. E., Stura, E. A., Levitt, D. G., Lee, H. C. & Stout, C. D. Crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectozyme CD38. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 957–964 (1996).
116. Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R. M., Walseth, T. F. & Lee, H. C. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**, 1056–1059 (1993).
117. Cockayne, D. A., Muchamuel, T., Grimaldi, J. C., Muller-Steffner, H., Randall, T. D., Lund, F. E., Murray, R., Schuber, F. & Howard, M. C. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* **92**, 1324–1333 (1998).

118. Chini, E. N., Chini, C. C. S., Kato, I., Takasawa, S. & Okamoto, H. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem. J.* **362**, 125–130 (2002).
119. Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F. & Lee, H. C. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* **270**, 30327–30333 (1995).
120. Guse, A. H., da Silva, C. P., Berg, I., Skapenko, A. L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G. A., Schulze-Koops, H., Potter, B. V. & Mayr, G. W. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **398**, 70–73 (1999).
121. Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H. & Malavasi, F. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J. Immunol.* **160**, 395–402 (1998).
122. Fernández, J. E., Deaglio, S., Donati, D., Beusan, I. S., Corno, F., Aranega, A., Forni, M., Falini, B. & Malavasi, F. Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **12**, 81–91 (1998).
123. Dianzani, U., Funaro, A., DiFranco, D., Garbarino, G., Bragardo, M., Redoglia, V., Buonfiglio, D., De Monte, L. B., Pileri, A. & Malavasi, F. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J. Immunol.* **153**, 952–959 (1994).
124. Cesano, A., Visonneau, S., Deaglio, S., Malavasi, F. & Santoli, D. Role of CD38 and its ligand in the regulation of MHC-nonrestricted cytotoxic T cells. *J. Immunol.* **160**, 1106–1115 (1998).
125. van de Donk, N. W. C. J., Richardson, P. G. & Malavasi, F. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood* **131**, 13–29 (2018).
126. Wilcock, P. & Webster, R. The multiple myeloma drug market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 579–580 (2019).
127. Deckert, J., Wetzels, M.-C., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Goldmacher, V. S., Vallée, F., Zhou-Liu, Q., Ferrari, P., Pouzieux, S., Lahoute, C., Dumontet, C., Plesa, A., Chiron, M., Lejeune, P.,

- Chittenden, T., Park, P. U. & Blanc, V. SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4574–4583 (2014).
128. Lee, H. T., Kim, Y., Park, U. B., Jeong, T. J., Lee, S. H. & Heo, Y.-S. Crystal structure of CD38 in complex with daratumumab, a first-in-class anti-CD38 antibody drug for treating multiple myeloma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **536**, 26–31 (2021).
129. Haffner, C. D., Becherer, J. D., Boros, E. E., Cadilla, R., Carpenter, T., Cowan, D., Deaton, D. N., Guo, Y., Harrington, W., Henke, B. R., Jeune, M. R., Kaldor, I., Milliken, N., Petrov, K. G., Preugschat, F., Schulte, C., Shearer, B. G., Shearer, T., Smalley, T. L., Stewart, E. L., Stuart, J. D. & Ulrich, J. C. Discovery, synthesis, and biological evaluation of Thiazoloquin(az)olin(on)es as potent CD38 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 3548–3571 (2015).
130. Tarragó, M. G., Chini, C. C. S., Kanamori, K. S., Warner, G. M., Caride, A., de Oliveira, G. C., Rud, M., Samani, A., Hein, K. Z., Huang, R., Jurk, D., Cho, D. S., Boslett, J. J., Miller, J. D., Zweier, J. L., Passos, J. F., Doles, J. D., Becherer, D. J. & Chini, E. N. A potent and specific CD38 inhibitor ameliorates age-related metabolic dysfunction by reversing tissue NAD⁺ decline. *Cell Metab.* **27**, 1081-1095.e10 (2018).
131. Chini, E. N., Chini, C. C. S., Netto, J. M. E., de Oliveira, G. C. & van Schooten, W. The pharmacology of CD38/NADase: An emerging target for cancer and aging diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 424–436 (2018).
132. Guo, Y., Feng, K., Tong, C., Jia, H., Liu, Y., Wang, Y., Ti, D., Yang, Q., Wu, Z. & Han, W. Efficiency and side effects of anti-CD38 CAR T cells in an adult patient with relapsed B-ALL after failure of bi-specific CD19/CD22 CAR T cell treatment. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 430–432 (2020).
133. Cui, Q., Qian, C., Xu, N., Kang, L., Dai, H., Cui, W., Song, B., Yin, J., Li, Z., Zhu, X., Qu, C., Liu, T., Shen, W., Zhu, M., Yu, L., Wu, D. & Tang, X. CD38-directed CAR-T cell therapy: a novel immunotherapy strategy for relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 82 (2021).

134. Manier, S., Ingegnere, T., Escure, G., Prodhomme, C., Nudel, M., Mitra, S. & Facon, T. Current state and next-generation CAR-T cells in multiple myeloma. *Blood Rev.* **54**, 100929 (2022).
135. Shimasaki, N., Jain, A. & Campana, D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 200–218 (2020).
136. Ballow, M. Lymphocytes, monocytes, macrophages, and neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**, 1019–1023 (1989).
137. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
138. Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B. & Pforte, A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2053–2058 (1993).
139. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
140. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
141. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T. & Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6425–6440 (2018).
142. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
143. Quatromoni, J. G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* **4**, 376–389 (2012).
144. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F. & Garlanda, C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 799–820 (2022).
145. Nishida-Aoki, N. & Gujral, T. S. Polypharmacologic reprogramming of tumor-associated macrophages toward an inflammatory phenotype. *Cancer Res.* **82**, 433–446 (2022).

146. Mantovani, A. & Allavena, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* **212**, 435–445 (2015).
147. Genard, G., Lucas, S. & Michiels, C. Reprogramming of tumor-associated macrophages with anticancer therapies: Radiotherapy versus chemo- and immunotherapies. *Front. Immunol.* **8**, 828 (2017).
148. Molgora, M., Esaulova, E., Vermi, W., Hou, J., Chen, Y., Luo, J., Brioschi, S., Bugatti, M., Omodei, A. S., Ricci, B., Fronick, C., Panda, S. K., Takeuchi, Y., Gubin, M. M., Faccio, R., Cella, M., Gilfillan, S., Unanue, E. R., Artyomov, M. N., Schreiber, R. D. & Colonna, M. TREM2 Modulation Remodels the Tumor Myeloid Landscape Enhancing Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* **182**, 886-900.e17 (2020).
149. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
150. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531 (2011).
151. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* **210**, 1283–1299 (2013).
152. Mercer, F., Ng, S. H., Brown, T. M., Boatman, G. & Johnson, P. J. Neutrophils kill the parasite *Trichomonas vaginalis* using trogocytosis. *PLOS Biol.* **16**, e2003885 (2018).
153. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 181–218 (2014).
154. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K. & Koenderman, L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625–627 (2010).
155. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
156. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638–650 (2013).

157. van Rees, D. J., Szilagy, K., Kuijpers, T. W., Matlung, H. L. & van den Berg, T. K. Immunoreceptors on neutrophils. *Semin. Immunol.* **28**, 94–108 (2016).
158. Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R. & Mantovani, A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 485–503 (2020).
159. Bird, L. Neutrophil plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 673–673 (2009).
160. Fridlender, Z. G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G. S. & Albelda, S. M. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One* **7**, e31524 (2012).
161. Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C.-F., Gereke, M., von Köckritz-Blickwede, M., Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S. & Jablonska, J. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer* **138**, 1982–1993 (2016).
162. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
163. Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G. & Golstein, P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
164. Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B. & Bluestone, J. A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405–413 (1994).
165. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. & Honjo, T. 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 (2000).

166. Long, E. O. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol. Rev.* **224**, 70–84 (2008).
167. Parham, P., Norman, P. J., Abi-Rached, L. & Guethlein, L. A. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 800–811 (2012).
168. Barclay, A. N. & Brown, M. H. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 457–464 (2006).
169. Jaiswal, S., Jamieson, C. H. M., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N. & Weissman, I. L. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* **138**, 271–285 (2009).
170. Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y., George, B. M., Markovic, M., Ring, N. G., Tsai, J. M., McKenna, K. M., Ho, P. Y., Cheng, R. Z., Chen, J. Y., Barkal, L. J., Ring, A. M., Weissman, I. L. & Maute, R. L. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **19**, 76–84 (2018).
171. Chen, G.-Y., Tang, J., Zheng, P. & Liu, Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* **323**, 1722–1725 (2009).
172. Macauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 653–666 (2014).
173. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56–61 (2015).
174. Lonberg, N. & Korman, A. J. Masterful antibodies: Checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 275–281 (2017).
175. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
176. Korman, A. J., Garrett-Thomson, S. C. & Lonberg, N. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 509–528 (2022).

177. Xin Yu, J., Hubbard-Lucey, V. M. & Tang, J. Immuno-oncology drug development goes global. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 899–900 (2019).
178. Robert, C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat. Commun.* **11**, 3801 (2020).
179. Park, J.-J., Thi, E. P., Carpio, V. H., Bi, Y., Cole, A. G., Dorsey, B. D., Fan, K., Harasym, T., Iott, C. L., Kadhim, S., Kim, J. H., Lee, A. C. H., Nguyen, D., Paratala, B. S., Qiu, R., White, A., Lakshminarasimhan, D., Leo, C., Suto, R. K., Rijnbrand, R., Tang, S., Sofia, M. J. & Moore, C. B. Checkpoint inhibition through small molecule-induced internalization of programmed death-ligand 1. *Nat. Commun.* **12**, 1222 (2021).
180. Chao, M. P., Weissman, I. L. & Majeti, R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 225–232 (2012).
181. Weiskopf, K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis. *Eur. J. Cancer* **76**, 100–109 (2017).
182. Ledford, H., Else, H. & Warren, M. Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize. *Nature* **562**, 20–21 (2018).
183. Murata, Y., Kotani, T., Ohnishi, H. & Matozaki, T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J. Biochem.* **155**, 335–344 (2014).
184. Barclay, A. N. & Van den Berg, T. K. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 25–50 (2014).
185. Brown, E. J. & Frazier, W. A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* **11**, 130–135 (2001).
186. Jiang, P., Lagenaur, C. F. & Narayanan, V. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **274**, 559–562 (1999).

187. Hatherley, D., Graham, S. C., Turner, J., Harlos, K., Stuart, D. I. & Barclay, A. N. Paired receptor specificity explained by structures of signal regulatory proteins alone and complexed with CD47. *Mol. Cell* **31**, 266–277 (2008).
188. Gao, A. G., Lindberg, F. P., Finn, M. B., Blystone, S. D., Brown, E. J. & Frazier, W. A. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **271**, 21–24 (1996).
189. Betancur, P. A., Abraham, B. J., Yiu, Y. Y., Willingham, S. B., Khameneh, F., Zarnegar, M., Kuo, A. H., McKenna, K., Kojima, Y., Leeper, N. J., Ho, P., Gip, P., Swigut, T., Sherwood, R. I., Clarke, M. F., Somlo, G., Young, R. A. & Weissman, I. L. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nat. Commun.* **8**, 14802 (2017).
190. Liu, F., Dai, M., Xu, Q., Zhu, X., Zhou, Y., Jiang, S., Wang, Y., Ai, Z., Ma, L., Zhang, Y., Hu, L., Yang, Q., Li, J., Zhao, S., Zhang, Z. & Teng, Y. SRSF10-mediated IL1RAP alternative splicing regulates cervical cancer oncogenesis via mIL1RAP-NF- κ B-CD47 axis. *Oncogene* **37**, 2394–2409 (2018).
191. Chen, J., Zheng, D.-X., Yu, X.-J., Sun, H.-W., Xu, Y.-T., Zhang, Y.-J. & Xu, J. Macrophages induce CD47 upregulation via IL-6 and correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Oncoimmunology* **8**, e1652540 (2019).
192. Zhang, H., Lu, H., Xiang, L., Bullen, J. W., Zhang, C., Samanta, D., Gilkes, D. M., He, J. & Semenza, G. L. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E6215-6223 (2015).
193. Casey, S. C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K. N., Gouw, A. M., Baylot, V., Gütgemann, I., Eilers, M. & Felsher, D. W. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* **352**, 227–231 (2016).
194. Huang, C.-Y., Ye, Z.-H., Huang, M.-Y. & Lu, J.-J. Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Transl. Oncol.* **13**, 100862 (2020).
195. Logtenberg, M. E. W., Jansen, J. H. M., Raaben, M., Toebes, M., Franke, K., Brandsma, A. M., Matlung, H. L., Fauster, A., Gomez-Eerland, R., Bakker, N. A. M., van der Schot, S., Marijt, K. A.,

- Verdoes, M., Haanen, J. B. A. G., van den Berg, J. H., Neefjes, J., van den Berg, T. K., Brummelkamp, T. R., Leusen, J. H. W., Scheeren, F. A. & Schumacher, T. N. Glutaminyl cyclase is an enzymatic modifier of the CD47- SIRP α axis and a target for cancer immunotherapy. *Nat. Med.* **25**, 612–619 (2019).
196. Wu, Z., Weng, L., Zhang, T., Tian, H., Fang, L., Teng, H., Zhang, W., Gao, J., Hao, Y., Li, Y., Zhou, H. & Wang, P. Identification of glutaminyl cyclase isoenzyme isoQC as a regulator of SIRP α -CD47 axis. *Cell Res.* **29**, 502–505 (2019).
197. Huang, K.-F., Liu, Y.-L., Cheng, W.-J., Ko, T.-P. & Wang, A. H.-J. Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13117–13122 (2005).
198. Seifert, F., Schulz, K., Koch, B., Manhart, S., Demuth, H.-U. & Schilling, S. Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* **48**, 11831–11833 (2009).
199. Fischer, W. H. & Spiess, J. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3628–3632 (1987).
200. Schilling, S., Manhart, S., Hoffmann, T., Ludwig, H.-H., Wasternack, C. & Demuth, H.-U. Substrate specificity of glutaminyl cyclases from plants and animals. *Biol. Chem.* **384**, 1583–1592 (2003).
201. Becker, A., Eichentopf, R., Sedlmeier, R., Waniek, A., Cynis, H., Koch, B., Stephan, A., Bäuscher, C., Kohlmann, S., Hoffmann, T., Kehlen, A., Berg, S., Freyse, E.-J., Osmand, A., Plank, A.-C., Roßner, S., von Hörsten, S., Graubner, S., Demuth, H.-U. & Schilling, S. IsoQC (QPCTL) knock-out mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes. *Biol. Chem.* **397**, 45–55 (2016).
202. van den Berg, T. K., van Beek, E. M., Bühring, H.-J., Colonna, M., Hamaguchi, M., Howard, C. J., Kasuga, M., Liu, Y., Matozaki, T., Neel, B. G., Parkos, C. A., Sano, S., Vignery, A., Vivier, E.,

- Wright, M., Zawatzky, R. & Barclay, A. N. A nomenclature for signal regulatory protein family members. *J. Immunol.* **175**, 7788–7789 (2005).
203. Kharitonov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J. & Ullrich, A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* **386**, 181–186 (1997).
204. Hatherley, D., Graham, S. C., Harlos, K., Stuart, D. I. & Barclay, A. N. Structure of signal-regulatory protein α : a link to antigen receptor evolution. *J. Biol. Chem.* **284**, 26613–26619 (2009).
205. Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. & Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol.* **19**, 72–80 (2009).
206. Li, W., Gupta, S. K., Han, W., Kundson, R. A., Nelson, S., Knutson, D., Greipp, P. T., ElSawa, S. F., Sotomayor, E. M. & Gupta, M. Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 73 (2019).
207. Sun, S., Hang, T., Zhang, B., Zhu, L., Wu, Y., Lv, X., Huang, Q. & Yao, H. miRNA-708 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting ZEB1 through Akt/mTOR signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 5338–5356 (2019).
208. Schneider, E., Pochert, N., Ruess, C., MacPhee, L., Escano, L., Miller, C., Krowiorz, K., Delsing Malmberg, E., Heravi-Moussavi, A., Lorzadeh, A., Ashouri, A., Grasedieck, S., Sperb, N., Kumar Koppurapu, P., Iben, S., Staffas, A., Xiang, P., Rösler, R., Kanduri, M., Larsson, E., Fogelstrand, L., Döhner, H., Döhner, K., Wiese, S., Hirst, M., Keith Humphries, R., Palmqvist, L., Kuchenbauer, F. & Rouhi, A. MicroRNA-708 is a novel regulator of the Hoxa9 program in myeloid cells. *Leukemia* **34**, 1253–1265 (2020).
209. Huang, W., Wang, W.-T., Fang, K., Chen, Z.-H., Sun, Y.-M., Han, C., Sun, L.-Y., Luo, X.-Q. & Chen, Y.-Q. MIR-708 promotes phagocytosis to eradicate T-ALL cells by targeting CD47. *Mol. Cancer* **17**, 12 (2018).

210. Rastgoo, N., Wu, J., Liu, A., Pourabdollah, M., Atenafu, E. G., Reece, D., Chen, W. & Chang, H. Targeting CD47/TNFAIP8 by miR-155 overcomes drug resistance and inhibits tumor growth through induction of phagocytosis and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* **105**, 2813–2823 (2020).
211. Zhao, Y., Yu, X., Tang, H., Han, R., Wang, X., Wang, J., Wang, K. & Li, G. MicroRNA-200a promotes phagocytosis of macrophages and suppresses cell proliferation, migration, and invasion in nasopharyngeal carcinoma by targeting CD47. *BioMed. Res. Int.* **2020**, 3723781 (2020).
212. Schilling, S., Niestroj, A. J., Rahfeld, J.-U., Hoffmann, T., Wermann, M., Zunkel, K., Wasternack, C. & Demuth, H.-U. Identification of human glutaminyl cyclase as a metalloenzyme. Potent inhibition by imidazole derivatives and heterocyclic chelators. *J. Biol. Chem.* **278**, 49773–49779 (2003).
213. Vijayan, D. K. & Zhang, K. Y. J. Human glutaminyl cyclase: Structure, function, inhibitors and involvement in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* **147**, 104342 (2019).
214. Pozzi, C., Di Pisa, F., Benvenuti, M. & Mangani, S. The structure of the human glutaminyl cyclase-SEN177 complex indicates routes for developing new potent inhibitors as possible agents for the treatment of neurological disorders. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 1219–1226 (2018).
215. Maute, R., Xu, J. & Weissman, I. L. CD47-SIRP α -targeted therapeutics: status and prospects. *Immuno-Oncol. Technol.* **13**, 100070 (2022).
216. Liu, J., Wang, L., Zhao, F., Tseng, S., Narayanan, C., Shura, L., Willingham, S., Howard, M., Prohaska, S., Volkmer, J., Chao, M., Weissman, I. L. & Majeti, R. Pre-clinical development of a humanized anti-CD47 antibody with anti-cancer therapeutic potential. *PLoS One* **10**, e0137345 (2015).
217. Advani, R., Flinn, I., Popplewell, L., Forero, A., Bartlett, N. L., Ghosh, N., Kline, J., Roschewski, M., LaCasce, A., Collins, G. P., Tran, T., Lynn, J., Chen, J. Y., Volkmer, J.-P., Agoram, B., Huang, J.,

- Majeti, R., Weissman, I. L., Takimoto, C. H., Chao, M. P. & Smith, S. M. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1711–1721 (2018).
218. van den Berg, T. K. & Valerius, T. Myeloid immune-checkpoint inhibition enters the clinical stage. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 275–276 (2019).
219. Daver, N. G., Vyas, P., Kambhampati, S., Al Malki, M. M., Larson, R. A., Asch, A. S., Mannis, G. N., Chai-Ho, W., Tanaka, T. N., Bradley, T. J., Jeyakumar, D., Wang, E. S, Xing, G., Chao, M., Ramsingh, G., Renard, C., Lal, I., Zeidner, J. F. & Sallman, A. D. Tolerability and efficacy of the first-in-class anti-CD47 antibody magrolimab combined with azacitidine in frontline TP53m AML patients: Phase 1b results. *J. Clin. Oncol.* **40**, 7020 (2022).
220. Petrova, P. S., Viller, N. N., Wong, M., Pang, X., Lin, G. H. Y., Dodge, K., Chai, V., Chen, H., Lee, V., House, V., Vigo, N. T., Jin, D., Mutukura, T., Charbonneau, M., Truong, T., Viau, S., Johnson, L. D., Linderoth, E., Sievers, E. L., Maleki Vareki, S., Figueredo, R., Pampillo, M., Koropatnick, J., Trudel, S., Mbong, N., Jin, L., Wang, J. C. Y. & Uger, R. A. TTI-621 (SIRP α Fc): A CD47-blocking innate immune checkpoint inhibitor with broad antitumor activity and minimal erythrocyte binding. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1068–1079 (2017).
221. Zhang, W., Huang, Q., Xiao, W., Zhao, Y., Pi, J., Xu, H., Zhao, H., Xu, J., Evans, C. E. & Jin, H. Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRP α axis. *Front. Immunol.* **11**, 18 (2020).
222. Champiat, S., Cassier, P. A., Kotecki, N., Korakis, I., Vinceneux, A., Jungels, C., Blatchford, J., Elgadi, M. M., Clarke, N., Fromond, C., Poirier, N., Vasseur, B., Marabelle, A. & Delord, J-P. Safety, pharmacokinetics, efficacy, and preliminary biomarker data of first-in-class BI 765063, a selective SIRP α inhibitor: Results of monotherapy dose escalation in phase 1 study in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **39**, 2623 (2021).
223. Wang, H., Sun, Y., Zhou, X., Chen, C., Jiao, L., Li, W., Gou, S., Li, Y., Du, J., Chen, G., Zhai, W., Wu, Y., Qi, Y. & Gao, Y. CD47/SIRP α blocking peptide identification and synergistic effect with irradiation for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000905 (2020).

224. Hazama, D., Yin, Y., Murata, Y., Matsuda, M., Okamoto, T., Tanaka, D., Terasaka, N., Zhao, J., Sakamoto, M., Kakuchi, Y., Saito, Y., Kotani, T., Nishimura, Y., Nakagawa, A., Suga, H. & Matozaki, T. Macrocyclic peptide-mediated blockade of the CD47-SIRP α interaction as a potential cancer immunotherapy. *Cell Chem. Biol.* **27**, 1181-1191.e7 (2020).
225. Vafa, O., Gilliland, G. L., Brezski, R. J., Strake, B., Wilkinson, T., Lacy, E. R., Scallon, B., Teplyakov, A., Malia, T. J. & Strohl, W. R. An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. *Methods.* **65**, 114–126 (2014).
226. Uger, R. A., Slavova-Petrova, P. S. & Pang, X. Treatment of CD47+ disease cells with SIRP α -FC fusions. patent no. US20150329616A1 (2015).
227. Homo sapiens CD47 molecule (CD47), transcript variant 1, mRNA.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001777.4 [Accessed March 31, 2023].
228. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. & Minor, L. Cell viability assays. In: Assay Guidance Manual, 2004.
229. van Egmond, M., van Vuuren, A. J., Morton, H. C., van Spriël, A. B., Shen, L., Hofhuis, F. M., Saito, T., Mayadas, T. N., Verbeek, J. S. & van de Winkel, J. G. Human immunoglobulin A receptor (Fc α RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* **93**, 4387–4394 (1999).
230. Lim, S. H., Vaughan, A. T., Ashton-Key, M., Williams, E. L., Dixon, S. V., Chan, H. T. C., Beers, S. A., French, R. R., Cox, K. L., Davies, A. J., Potter, K. N., Mockridge, C. I., Oscier, D. G., Johnson, P. W. M., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. Fc γ receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* **118**, 2530–2540 (2011).
231. Huang, S. M., Bock, J. M. & Harari, P. M. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* **59**, 1935–1940 (1999).
232. Kleiveland, C. R. Peripheral blood mononuclear cells. In: The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models, Springer Verlag, 2015.

233. Sosale, N. G., Rouhiparkouhi, T., Bradshaw, A. M., Dimova, R., Lipowsky, R. & Discher, D. E. Cell rigidity and shape override CD47's 'self'-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood* **125**, 542–552 (2015).
234. Bayón-Calderón, F., Toribio, M. L. & González-García, S. Facts and challenges in immunotherapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7685 (2020).
235. Müller, K., Vogiatzi, F., Winterberg, D., Rösner, T., Lenk, L., Bastian, L., Gehlert, C. L., Autenrieb, M.-P., Brüggemann, M., Cario, G., Schrappe, M., Kulozik, A. E., Eckert, C., Bergmann, A. K., Bornhauser, B., Bourquin, J.-P., Valerius, T., Peipp, M., Kellner, C. & Schewe, D. M. Combining daratumumab with CD47 blockade prolongs survival in preclinical models of pediatric T-ALL. *Blood* **140**, 45–57 (2022).
236. Hayes, B. H., Tsai, R. K., Dooling, L. J., Kadu, S., Lee, J. Y., Pantano, D., Rodriguez, P. L., Subramanian, S., Shin, J.-W. & Discher, D. E. Macrophages show higher levels of engulfment after disruption of cis interactions between CD47 and the checkpoint receptor SIRP α . *J. Cell Sci.* **133**, 237800 (2020).
237. Nijhof, I. S., Groen, R. W. J., Lokhorst, H. M., van Kessel, B., Bloem, A. C., van Velzen, J., de Jong-Korlaar, R., Yuan, H., Noort, W. A., Klein, S. K., Martens, A. C. M., Doshi, P., Sasser, K., Mutis, T. & van de Donk, N. W. C. J. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia* **29**, 2039–2049 (2015).
238. Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841–850 (1995).
239. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940–954 (1996).
240. Rochette-Egly, C. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 66–75 (2015).

241. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
242. Emens, L. A. & Middleton, G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 436–443 (2015).
243. Carter, P. J. & Lazar, G. A. Next generation antibody drugs: pursuit of the ‘high-hanging fruit’. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 197–223 (2018).
244. Yu, J., Song, Y. & Tian, W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J. Hematol. Oncol.* **13**, 45 (2020).
245. Meyer, S., Nederend, M., Jansen, J. H. M., Reiding, K. R., Jacobino, S. R., Meeldijk, J., Bovenschen, N., Wuhrer, M., Valerius, T., Ubink, R., Boross, P., Rouwendal, G. & Leusen, J. H. W. Improved in vivo anti-tumor effects of IgA-Her2 antibodies through half-life extension and serum exposure enhancement by FcRn targeting. *mAbs* **8**, 87–98 (2016).
246. Evers, M., Stip, M., Keller, K., Willemsen, H., Nederend, M., Jansen, M., Chan, C., Budding, K., Nierkens, S., Valerius, T., Meyer-Wentrup, F., Eijkelkamp, N. & Leusen, J. Anti-GD2 IgA kills tumors by neutrophils without antibody-associated pain in the preclinical treatment of high-risk neuroblastoma. *J. Immunother. Cancer* **9**, e003163 (2021).
247. Morton, H. C., van Egmond, M. & van de Winkel, J. G. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit. Rev. Immunol.* **16**, 423–440 (1996).
248. Brandsma, A. M., Bondza, S., Evers, M., Koutstaal, R., Nederend, M., Jansen, J. H. M., Rösner, T., Valerius, T., Leusen, J. H. W. & Ten Broeke, T. Potent Fc receptor signaling by IgA leads to superior killing of cancer cells by neutrophils compared to IgG. *Front. Immunol.* **10**, 704 (2019).
249. Golay, J., Valgardsdottir, R., Musaraj, G., Giupponi, D., Spinelli, O. & Introna, M. Human neutrophils express low levels of FcγRIIIA, which plays a role in PMN activation. *Blood* **133**, 1395–1405 (2019).
250. Vidarsson, G. & van de Winkel, J. G. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **11**, 271–278 (1998).

251. Treffers, L. W., van Houdt, M., Bruggeman, C. W., Heineke, M. H., Zhao, X. W., van der Heijden, J., Nagelkerke, S. Q., Verkuijlen, P. J. J. H., Geissler, J., Lissenberg-Thunnissen, S., Valerius, T., Peipp, M., Franke, K., van Bruggen, R., Kuijpers, T. W., van Egmond, M., Vidarsson, G., Matlung, H. L. & van den Berg, T. K. FcγRIIIb restricts antibody-dependent destruction of cancer cells by human neutrophils. *Front. Immunol.* **9**, 3124 (2018).
252. Strober, W., Wochner, R. D., Barlow, M. H., McFarlin, D. E. & Waldmann, T. A. Immunoglobulin metabolism in ataxia telangiectasia. *J. Clin. Invest.* **47**, 1905–1915 (1968).
253. Challacombe, S. J. & Russell, M. W. Estimation of the intravascular half-lives of normal rhesus monkey IgG, IgA and IgM. *Immunology* **36**, 331–338 (1979).
254. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715–725 (2007).
255. Borrok, M. J., Luheshi, N. M., Beyaz, N., Davies, G. C., Legg, J. W., Wu, H., Dall'Acqua, W. F. & Tsui, P. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with FcαRI (CD89) binding. *mAbs* **7**, 743–751 (2015).
256. Lombana, T. N., Rajan, S., Zorn, J. A., Mandikian, D., Chen, E. C., Estevez, A., Yip, V., Bravo, D. D., Phung, W., Farahi, F., Viajar, S., Lee, S., Gill, A., Sandoval, W., Wang, J., Ciferri, C., Boswell, C. A., Matsumoto, M. L. & Spiess, C. Production, characterization, and in vivo half-life extension of polymeric IgA molecules in mice. *mAbs* **11**, 1122–1138 (2019).
257. Deo, Y. M., Sundarapandiyam, K., Keler, T., Wallace, P. K. & Graziano, R. F. Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (FcαRI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J. Immunol.* **160**, 1677–1686 (1998).
258. Stockmeyer, B., Dechant, M., van Egmond, M., Tutt, A. L., Sundarapandiyam, K., Graziano, R. F., Repp, R., Kalden, J. R., Gramatzki, M., Glennie, M. J., van de Winkel, J. G. & Valerius, T. Triggering Fc α-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy. *J. Immunol.* **165**, 5954–5961 (2000).

259. Xu, L., Li, B., Pi, C., Zhu, Z., Tao, F., Xie, K., Feng, Y., Xu, X., Yin, Y., Gu, H. & Fang, J. Targeting CD89 on tumor-associated macrophages overcomes resistance to immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer* **10**, e005447 (2022).
260. Ey, P. L., Prowse, S. J. & Jenkin, C. R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* **15**, 429–436 (1978).
261. Grov, A. Human colostral IgA interacting with staphylococcal protein A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **84**, 71–72 (1976).
262. Woof, J. M. & Kerr, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* **208**, 270–282 (2006).
263. Lohse, S., Brunke, C., Derer, S., Peipp, M., Boross, P., Kellner, C., Beyer, T., Dechant, M., van der Winkel, J. G. J., Leusen, J. H. W. & Valerius, T. Characterization of a mutated IgA2 antibody of the m(1) allotype against the epidermal growth factor receptor for the recruitment of monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 25139–25150 (2012).
264. Barreira da Silva, R., Leitao, R. M., Pechuan-Jorge, X., Werneke, S., Oeh, J., Javinal, V., Wang, Y., Phung, W., Everett, C., Nonomiya, J., Arnott, D., Lu, C., Hsiao, Y.-C., Koerber, J. T., Hötzel, I., Ziai, J., Modrusan, Z., Pillow, T. H., Roose-Girma, M., Schartner, J. M., Merchant, M., Rutz, S., Eidenschenk, C., Mellman, I. & Albert, M. L. Loss of the intracellular enzyme QPCTL limits chemokine function and reshapes myeloid infiltration to augment tumor immunity. *Nat. Immunol.* **23**, 568–580 (2022).
265. Boissonnas, A. & Combadière, C. Modulating the tumor-associated macrophage landscape. *Nat. Immunol.* **23**, 481–482 (2022).
266. Bresser, K., Logtenberg, M. E. W., Toebes, M., Proost, N., Sprengers, J., Siteur, B., Boeije, M., Kroese, L. J. & Schumacher, T. N. QPCTL regulates macrophage and monocyte abundance and inflammatory signatures in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* **11**, 2049486 (2022).

267. Scheltens, P., Hallikainen, M., Grimmer, T., Duning, T., Gouw, A. A., Teunissen, C. E., Wink, A. M., Maruff, P., Harrison, J., van Baal, C. M., Bruins, S., Lues, I. & Prins, N. D. Safety, tolerability and efficacy of the glutaminyl cyclase inhibitor PQ912 in Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2a study. *Alzheimers Res. Ther.* **10**, 107 (2018).
268. Bader, M. Vivoryon Therapeutics Receives FDA Fast Track Designation for Varoglutamstat in Early Alzheimer's Disease. *Vivoryon* <https://www.vivoryon.com/vivoryon-therapeutics-receives-fda-fast-track-designation-for-varoglutamstat-in-early-alzheimers-disease/> (2021) [Accessed March 31, 2023].
269. Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Myklebust, J. H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A. C., Chan, C. K., Tan, B. T., Park, C. Y., Zhao, F., Kohrt, H. E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R. D., Lossos, I. S., Levy, R., Weissman, I. L. & Majeti, R. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* **142**, 699–713 (2010).
270. Upton, R., Banuelos, A., Feng, D., Biswas, T., Kao, K., McKenna, K., Willingham, S., Ho, P. Y., Rosental, B., Tal, M. C., Raveh, T., Volkmer, J.-P., Pegram, M. D. & Weissman, I. L. Combining CD47 blockade with trastuzumab eliminates HER2-positive breast cancer cells and overcomes trastuzumab tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2026849118 (2021).
271. Zeller, T., Lutz, S., Münnich, I. A., Windisch, R., Hilger, P., Herold, T., Tahiri, N., Banck, J. C., Weigert, O., Moosmann, A., von Bergwelt-Baildon, M., Flamann, C., Bruns, H., Wichmann, C., Baumann, N., Valerius, T., Schewe, D. M., Peipp, M., Rösner, T., Humpe, A. & Kellner, C. Dual checkpoint blockade of CD47 and LILRB1 enhances CD20 antibody-dependent phagocytosis of lymphoma cells by macrophages. *Front. Immunol.* **13**, 929339 (2022).
272. Gilead Sciences. A Phase 2, Randomized, Open-Label Study Evaluating the Safety and Efficacy of Magrolimab in Combination With Bevacizumab and FOLFIRI Versus Bevacizumab and FOLFIRI in

- Previously Treated Advanced Inoperable Metastatic Colorectal Cancer (mCRC).
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05330429> (2023) [Accessed March 31, 2023].
273. Gilead Sciences. A Phase 2 Multi-Arm Study of Magrolimab Combinations in Patients With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04892446> (2023) [Accessed March 31, 2023].
274. Stanford University. A Phase 2 Study of Magrolimab and Pembrolizumab in Relapsed or Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04788043> (2022) [Accessed March 31, 2023].
275. Piccione, E. C., Juarez, S., Liu, J., Tseng, S., Ryan, C. E., Narayanan, C., Wang, L., Weiskopf, K. & Majeti, R. A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selectively binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells. *mAbs* **7**, 946–956 (2015).
276. Dheilly, E., Moine, V., Broyer, L., Salgado-Pires, S., Johnson, Z., Papaioannou, A., Cons, L., Calloud, S., Majocchi, S., Nelson, R., Rousseau, F., Ferlin, W., Kosco-Vilbois, M., Fischer, N. & Masternak, K. Selective blockade of the ubiquitous checkpoint receptor CD47 is enabled by dual-targeting bispecific antibodies. *Mol. Ther.* **25**, 523–533 (2017).
277. Ma, L., Zhu, M., Gai, J., Li, G., Chang, Q., Qiao, P., Cao, L., Chen, W., Zhang, S. & Wan, Y. Preclinical development of a novel CD47 nanobody with less toxicity and enhanced anti-cancer therapeutic potential. *J. Nanobiotechnology* **18**, 12 (2020).
278. Weiskopf, K., Ring, A. M., Ho, C. C. M., Volkmer, J.-P., Levin, A. M., Volkmer, A. K., Ozkan, E., Fernhoff, N. B., van de Rijn, M., Weissman, I. L. & Garcia, K. C. Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science* **341**, 88–91 (2013).
279. Huang, J., Liu, F., Li, C., Liang, X., Li, C., Liu, Y., Yi, Z., Zhang, L., Fu, S. & Zeng, Y. Role of CD47 in tumor immunity: a potential target for combination therapy. *Sci. Rep.* **12**, 9803 (2022).
280. Arrieta, O., Aviles-Salas, A., Orozco-Morales, M., Hernández-Pedro, N., Cardona, A. F., Cabrera-Miranda, L., Barrios-Bernal, P., Soca-Chafre, G., Cruz-Rico, G., Peña-Torres, M. de L., Moncada-Claudio, G. & Ramirez-Tirado, L.-A. Association between CD47 expression, clinical

- characteristics and prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* **9**, 2390–2402 (2020).
281. Shi, M., Gu, Y., Jin, K., Fang, H., Chen, Y., Cao, Y., Liu, X., Lv, K., He, X., Lin, C., Liu, H., Li, H., He, H., Qin, J., Li, R., Zhang, H. & Zhang, W. CD47 expression in gastric cancer clinical correlates and association with macrophage infiltration. *Cancer Immunol. Immunother.* **70**, 1831–1840 (2021).
282. Kim, H., Jee, S., Kim, Y., Sim, J., Bang, S., Son, H. K., Park, H., Myung, J., Ko, Y. H. & Paik, S. S. Correlation of CD47 Expression with Adverse Clinicopathologic Features and an Unfavorable Prognosis in Colorectal Adenocarcinoma. *Diagn. Basel Switz.* **11**, 668 (2021).
283. Imam, R., Chang, Q., Black, M., Yu, C. & Cao, W. CD47 expression and CD163+ macrophages correlated with prognosis of pancreatic neuroendocrine tumor. *BMC Cancer* **21**, 320 (2021).
284. Derer, S., Bauer, P., Lohse, S., Scheel, A. H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M. & Valerius, T. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J. Immunol.* **189**, 5230–5239 (2012).
285. Zhang, X., Feng, S., Xu, J., Zhao, N., Hu, X., Zhou, L., Tong, J., Xue, L., Zhang, L., Han, Y., Wang, X., Geng, L., Zhu, X., Tang, B., Liu, H., Zhu, W., Cai, X., Liu, X., Sun, Z. & Zheng, C. All-trans retinoic acid 45 mg/m² is superior to 25 mg/m² as the first induction regimen for the treatment of acute promyelocytic leukaemia: a retrospective analysis in a real-world clinical setting. *Blood Cancer J.* **11**, 15 (2021).
286. Frerichs, K. A., Minnema, M. C., Levin, M.-D., Broijl, A., Bos, G. M. J., Kersten, M. J., Mutis, T., Verkleij, C. P. M., Nijhof, I. S., Maas-Bosman, P. W. C., Klein, S. K., Zweegman, S., Sonneveld, P. & van de Donk, N. W. C. J. Efficacy and safety of daratumumab combined with all-trans retinoic acid in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood Adv.* **5**, 5128–5139 (2021).
287. Suter, E. C., Schmid, E. M., Harris, A. R., Voets, E., Francica, B. & Fletcher, D. A. Antibody:CD47 ratio regulates macrophage phagocytosis through competitive receptor phosphorylation. *Cell Rep.* **36**, 109587 (2021).

288. Li, J., Ballmer, S. G., Gillis, E. P., Fujii, S., Schmidt, M. J., Palazzolo, A. M. E., Lehmann, J. W., Morehouse, G. F. & Burke, M. D. Synthesis of many different types of organic small molecules using one automated process. *Science* **347**, 1221–1226 (2015).
289. Cruz, E. & Kayser, V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. *Biol. Targets Ther.* **13**, 33–51 (2019).
290. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–233 (2009).
291. Sae-Lee, W., McCafferty, C. L., Verbeke, E. J., Havugimana, P. C., Papoulas, O., McWhite, C. D., Houser, J. R., Vanuytsel, K., Murphy, G. J., Drew, K., Emili, A., Taylor, D. W. & Marcotte, E. M. The protein organization of a red blood cell. *Cell Rep.* **40**, 111103 (2022).

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ADC	<i>antibody drug conjugate</i> (Antikörper-Toxin-Konjugat)
ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
ADCP	<i>antibody dependent cell-mediated phagocytosis</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose)
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APL	akute Promyelozytenleukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ASGPR	Asialoglykoproteinrezeptor
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i> (all-trans Retinsäure)
B-ALL	akute lymphatische Leukämie der B-Zelle
B-NHL	non-Hodgkin-Lymphom der B-Zelle
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
C1q	Komplementfaktor 1q
C3a	Komplementkomponente 3a
C5a	Komplementkomponente 5a
cADPR	<i>cyclic ADP-ribose</i> (zyklische ADP-Ribose)
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CCL2/CCL5	CC-Chemokin-Ligand 2/5
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsgruppe)
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i> (komplementabhängige Zytotoxizität)
CDR	<i>complementary determining region</i> (komplementaritätsbestimmende Region)
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> (Ovar des chinesischen Hamsters)

CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> (gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochende, kurze Palindromwiederholungen)
CSFE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> (Oberflächenprotein auf T-Zellen)
CTX	Cetuximab
DARA	Daratumumab
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (standardisiertes Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E:T	Verhältnis von Effektorzelle zur Tumorzelle
EC50	effektive, halbmaximale Konzentration
EGF/EGFR (ErbB1)	<i>epidermal growth factor / epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor / epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
F _{ab}	<i>fragment of antigen binding</i> (Fragment zur Antigenbindung)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
Fc	<i>fragment crystalizable</i> (kristallisierbares Fragment)
Fc α	Fc-Rezeptor alpha
Fc γ	Fc-Rezeptor gamma
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i> (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i> (Granulozyten/Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor)

h	Stunde
HC	<i>heavy chain</i> (schwere Kette)
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IAP	<i>integrin associated protein</i> (integrinassoziertes Protein)
IC50	<i>inhibitory concentration 50</i> (halbmaximale, inhibierende Konzentration)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF γ	Interferon gamma
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> (tyrosinbasiertes, aktivierendes Motiv von Immunrezeptoren)
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> (tyrosinbasiertes, inhibierendes Motiv von Immunrezeptoren)
kDa	Kilodalton
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i> (Oberflächenrezeptor auf NK-Zellen)
KO	<i>Knock-Out</i> (vollständige Abschaltung eines Gens)
Konz.	Konzentration
Ktrl.	Kontrolle
kV	Kilovolt
l	Liter
LAT	<i>linker for activation of T-cells</i> (Oberflächenprotein auf T-Zellen)
LC	<i>light chain</i> (leichte Kette)
LILRB1	<i>leukocyte immunoglobulin like receptor B1</i> (Oberflächenprotein auf Leukozyten)
LRSC	<i>leukocyte reduction system chamber</i> (Leukozytenreduktionskammer)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic cell separation</i> (magnetische Zellsortierung)
m/z	Masse/Ladung
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> (Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor)

M	Molarität
mAK	monoklonaler Antikörper
mAU	milli Absorptionseinheit
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MΦ	Makrophage
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Salz
MTZ	Matuzumab
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenindinukleotid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nTg	nicht-transgen
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PANI	Panitumumab
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PD1	<i>programmed cell death protein 1</i> (Oberflächenprotein auf T-Zellen und Pro-B-Zellen)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (Thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktor)
PDX	<i>patient derived xenograft</i> (Patienten-abgeleitetes Xenotransplantat)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pGlu	Pyroglutamat
PI	phagozytischer Index
pIgR	<i>polymeric immunoglobulin receptor</i> (polymerer Immunglobulinrezeptor)

PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase C gamma
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QPCTL	<i>glutaminy-peptide cyclotransferase like</i> (Isoglutaminylyklase)
rel. U.	<i>relative unit</i> (relative Einheit)
RFI	relative Fluoreszenzintensität
ROI	<i>red objects per image</i> (rote Objekte pro Bild)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab
s	Sekunde
SABC	<i>specific antigen binding sites per cell</i> (spezifische Antigenbindungsstellen pro Zelle)
SC	<i>secretory component</i> (sekretorische Komponente)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SEN177	6''-Fluoro-4-(4-methyl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-[1,2';3',3'']terpyridin
SH2	<i>Src homology 2</i> (Proteindomäne zur Vermittlung von Proteininteraktionen)
SHP1/2	<i>Src homology phosphotyrosyl phosphatase 1/2</i> (Tyrosinphosphatasen mit SH2-Domänen)
SHPS-1	<i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1</i> (Oberflächenprotein auf myeloischen Zellen)
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
Siglec-10	<i>sialic acid immunoglobulin-like lectin 10</i> (Sialylsäure-bindendes Lektin 10)
SIRP α	<i>signal regulatory protein alpha</i> (Signal-regulierendes Protein alpha, Oberflächenprotein auf myeloischen Zellen)
T-ALL	akute lymphotische Leukämie der T-Zelle
TAM	tumorassoziierter Makrophage
TAN	tumorassoziierter Neutrophiler

TBS/T	<i>tris buffered saline/tween-20 (TRIS-gepufferte Saline/Tween-20)</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tg	transgen
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i> (transformierender Wachstumsfaktor beta)
T _H 1/2	T-Helferzelle 1/2
TMB	3,3,5,5-Tetramethylbenzidin
TNF/ α	<i>tumor necrosis factor /alpha</i> (Tumornekrosefaktor alpha)
TP53	<i>tumor protein 53</i> (Tumorprotein 53)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	<i>volume by volume</i> (Volumen-zu-Volumen)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung traditioneller monoklonaler Antikörper mit Beispielen im zeitlichen Verlauf.	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG1 und monomere IgA2m(1)-, IgA2m(2)- und IgA2.0-Antikörper.	7
Abbildung 3: Direkte, F _{ab} -vermittelte Effekte monoklonaler Antikörper in der Tumormimmuntherapie.	9
Abbildung 4: Indirekte, Fc-vermittelte Effekte monoklonaler Antikörper in der Tumormimmuntherapie.	12
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Typ I-Transmembranproteins EGFR (Monomer) mit den extrazellulären Domänen I – IV (links) und des Typ II-Transmembranproteins CD38 (rechts).....	16
Abbildung 6: Reaktion von Glutamin- oder Glutamatresten zu Pyroglutamat katalysiert durch Glutaminylzyklasen.....	22
Abbildung 7: Die Interaktion zwischen CD47 und SIRP α	23
Abbildung 8: SEN177 im Komplex mit einer Glutaminylzyklase.	24
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Fusionsproteins bestehend aus der CD47-Ektodomäne und dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Moleküls (oben) und die dazugehörige DNA-Sequenz (unten).	40
Abbildung 10: Exemplarische Vektorkarte pcDNA3.1(+) mit huCD47-IgG1 σ -Insertion; lila.	41
Abbildung 11: CD47-Expression auf den verwendeten soliden und hämatologischen Tumorzelllinien.	56
Abbildung 12: Expression von Fc-Rezeptoren und SIRP α auf humanen Makrophagen und Neutrophilen.	57
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung von untransfizierten und GFP-transfizierten CHO-S-Zellen.	58
Abbildung 14: Größenausschlusschromatographie von CD47-Fusionsproteinen.	59
Abbildung 15: Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CD47-Fusionsproteinen.	60
Abbildung 16: Peptidfragmente für die massenspektrometrische Analyse beider CD47-Fusionsproteine.....	61
Abbildung 17: Massenspektrometrische Analyse der CD47-Fusionsproteine.....	62
Abbildung 18: Bindungskapazitäten der CD47-Fusionsproteine im ELISA.....	64
Abbildung 19: Bindung der CD47-Fusionsproteine an Makrophagen und Neutrophile.....	65
Abbildung 20: Expression von EGFR und CD47 auf soliden Tumorzelllinien.....	66
Abbildung 21: CD47- und EGFR-Expression auf soliden Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177.	67
Abbildung 22: Reduktion der SIRP α -Fc Bindung auf soliden Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177.	69
Abbildung 23: Zellwachstum von EGFR-positiven Tumorzelllinien nach Behandlung mit SEN177.	70
Abbildung 24: Ermittlung der direkten Effekte von CTX auf das Wachstum von DiFi-Zellen ohne und nach Behandlung mit SEN177.	70
Abbildung 25: ⁵¹ Chromfreisetzungstests mit Cetuximab bei SEN177-behandelten A431-Zellen.....	72
Abbildung 26: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von EGFR-positiven Zellen ohne und mit SEN177-Behandlung.....	73
Abbildung 27: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber EGFR-positive Tumorzellen ohne und nach SEN177-Behandlung.....	75
Abbildung 28: Zeitabhängige Wiederherstellung der SIRP α -Fc Bindung nach SEN177 Behandlung....	76

Abbildung 29: Antikörpervermittelte Eliminierung von humanen MDA-MB-468-Zellen im xenogenen Mausmodell.....	77
Abbildung 30: Zusammengefasste Darstellung der Tumorzellbelastung aller mit PBS oder antikörperbehandelten Einzeltiere.	78
Abbildung 31: CD38- und CD47-Expression auf T-ALL-Tumorzelllinien.	79
Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen der antikörperabhängigen Makrophagen-vermittelten Phagozytose von MOLT-13-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	80
Abbildung 33: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von CD38-positiven T-ALL-Zellen.	81
Abbildung 34: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegen T-ALL-Zellen.....	82
Abbildung 35: CD38- und CD47-Expressionen von MOLT-13-Zellen mit genetischer Ablation der QPCTL und von CD47 im Vergleich zu Kontrollzellen.....	83
Abbildung 36: Immunblot zum Nachweis der Isoglutaminylyklase QPCTL in MOLT-13-Varianten. ...	84
Abbildung 37: Bindung von SIRP α -Fc und des CD47-Antikörpers CC2C6 an MOLT-13-Varianten.....	85
Abbildung 38: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von MOLT-13-Zellen. ..	86
Abbildung 39: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber MOLT-13-Zellen.	87
Abbildung 40: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von T-ALL-Zellen mit biologischer CD47-Blockade.....	89
Abbildung 41: Expression der Oberflächenproteine CD38 und CD47 auf Tumorzellen von drei T-ALL-Patienten.	90
Abbildung 42: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von T-ALL-Patientenzellen mit biologischer CD47-Blockade.	91
Abbildung 43: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber T-ALL-Zellen mit biologischer Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion.....	93
Abbildung 44: Zeitabhängiger Anstieg der CD38-Expression auf HSB-2-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATRA.	94
Abbildung 45: Die ATRA-Behandlung auf HSB-2-Zellen führt zum Anstieg der CD38-Expression, während die CD47-Expression unverändert bleibt.	95
Abbildung 46: Antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Phagozytose von HSB-2-Zellen nach ATRA-Behandlung mit biologischer CD47-Blockade.	96
Abbildung 47: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber HSB-2-Zellen.	97
Abbildung 48: Konzentrations- und zeitabhängige Reduktion der SIRP α -Fc Bindung an MDA-MB-468-Zellen nach Behandlung mit SEN177.....	162
Abbildung 49: Konzentrationsabhängige Bindung von SIRP α -Fc auf A431-Zellen nach SEN177 Behandlung.....	162
Abbildung 50: Bindungstitration von EGFR-gerichteten Antikörpern auf A431-Zellen	163
Abbildung 51: Bindungstitration unterschiedlicher EGFR-gerichteter Antikörper auf MDA-MB-468-Zellen.	163
Abbildung 52: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber MDA-MB-468-Zellen unter Verwendung von EGFR-gerichteten Antikörpern.	164
Abbildung 53: Bindung von Daratumumab-Varianten und hu5F9-IgG2 σ auf MOLT-13-Zellen.....	164
Abbildung 54: Bindung von hu5F9-IgG2 σ an HSB-2-Zellen nach ATRA-Behandlung.	165

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien.....	28
Tabelle 3: Lösungen und Puffer	30
Tabelle 4: Kits	32
Tabelle 5: Primärantikörper	33
Tabelle 6: Fusionsproteine	34
Tabelle 7: Kontrollantikörper und Sekundärantikörper	34
Tabelle 8: Bakterienstämme und Plasmide.....	35
Tabelle 9: Kulturmedien und Zusätze.....	35
Tabelle 10: Zelllinien.....	36
Tabelle 11: Geräte	37
Tabelle 12: Computerprogramme.....	38

11. Anhang

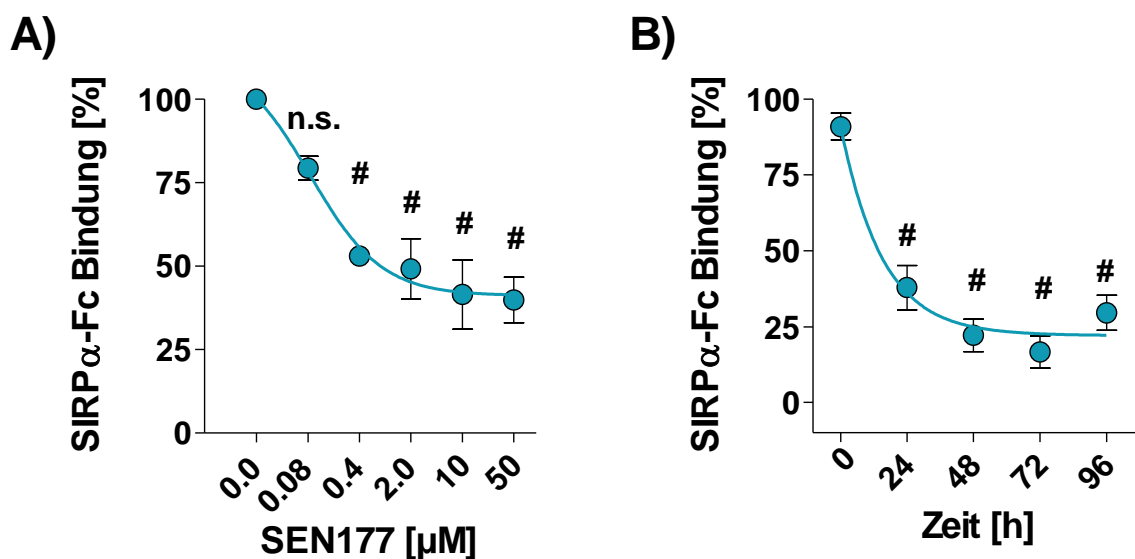


Abbildung 48: Konzentrations- und zeitabhängige Reduktion der SIRP α -Fc Bindung an MDA-MB-468-Zellen nach Behandlung mit SEN177.

MDA-MB-468-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SEN177 für 72 h (A) bzw. mit 10 μ M für unterschiedliche Zeiten (B) behandelt und anschließend die SIRP α -Fc Bindung (5 μ g/ml) mittels indirekter Durchflusszytometrie über Verwendung von PE-konjugierten anti-human IgG-Fc F(ab')₂-Fragmenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), # statistisch signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0 μ M SEN177 bzw. 0 h), n.s. nicht signifikant.

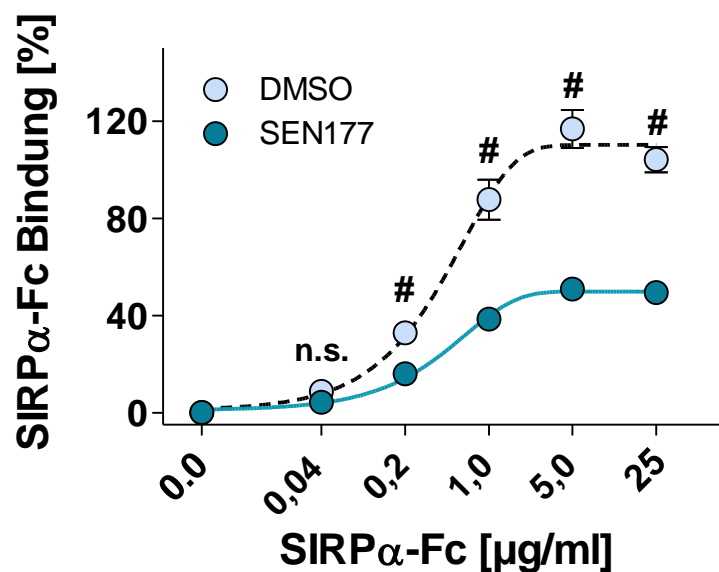


Abbildung 49: Konzentrationsabhängige Bindung von SIRP α -Fc auf A431-Zellen nach SEN177 Behandlung.

A431-Zellen wurden für 72 h mit 10 μ M SEN177 oder DMSO behandelt. Die SIRP α -Fc Bindung konnte mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt werden. Zur Detektion dienten PE-konjugierte anti-human IgG Fc F(ab')₂-Fragmente.

Abb. 49 ff.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente. Statistik: zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, # statistisch signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle, n.s. nicht signifikant).

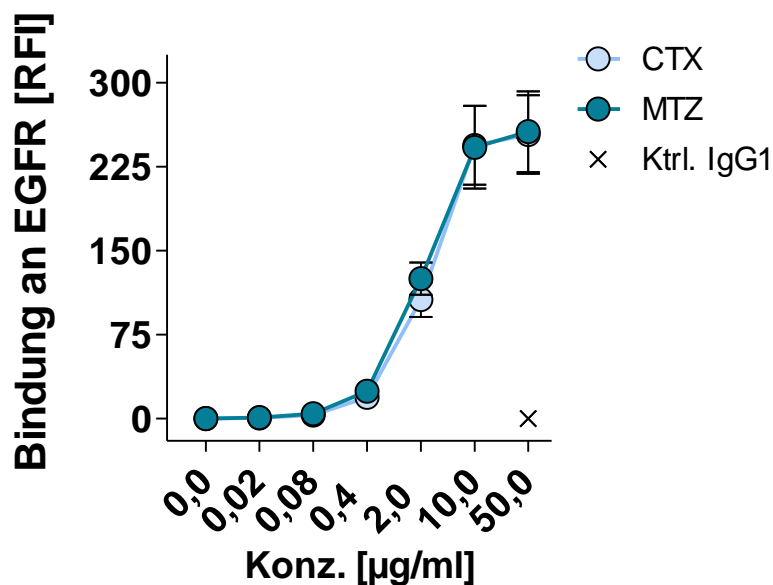


Abbildung 50: Bindungstiteration von EGFR-gerichteten Antikörpern auf A431-Zellen.

Die Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von CTX und MTZ (Ktrl. IgG1 = RTX) auf A431-Zellen wurde mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Detektion dienten FITC-konjugierte anti-human IgG-Fc F(ab')₂-Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente. RFI = relative Fluoreszenzintensität.

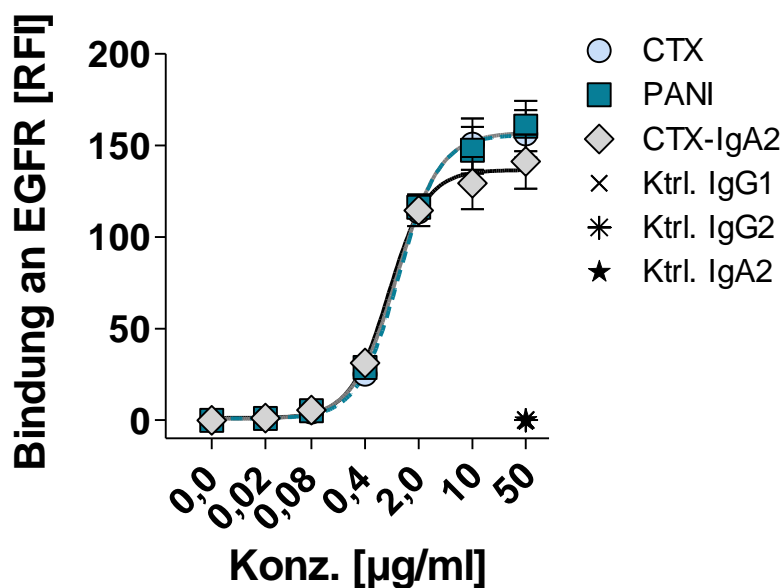


Abbildung 51: Bindungstiteration unterschiedlicher EGFR-gerichteter Antikörper auf MDA-MB-468-Zellen.

Die Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von CTX, PANI und CTX-IgA2 (Ktrl. IgG1 = RTX, Ktrl. IgG2 = RTX-IgG2, Ktrl. IgA2 = RTX-IgA2) auf MDA-MB-468-Zellen wurde in der indirekten Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Detektion dienten FITC-

Abb. 51 ff.

konjugierte anti-human Kappa-Leichtkette $F(ab')_2$ -Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente. RFI = relative Fluoreszenzintensität.

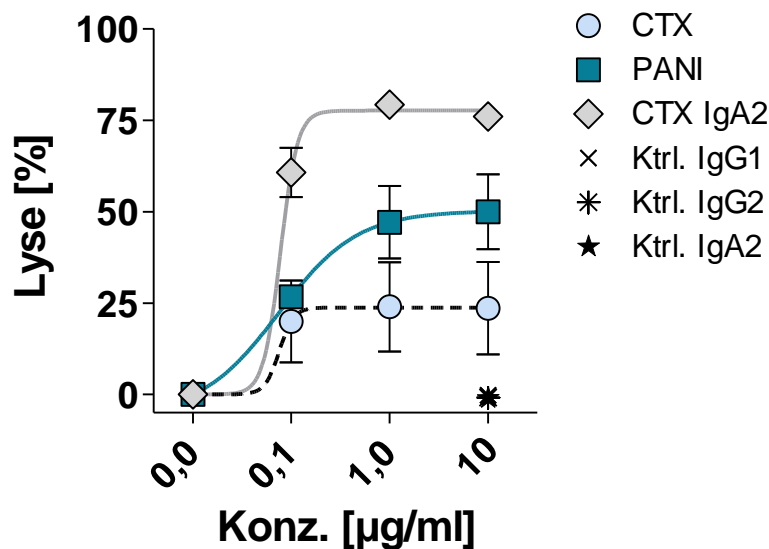


Abbildung 52: Antikörperabhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber MDA-MB-468-Zellen unter Verwendung von EGFR-gerichteten Antikörpern. MDA-MB-468-Zellen fungierten als Zielzellen in 51 Chromfreisetzungstests. Humane Neutrophile dienten als Effektoren (E:T = 80:1). Die Antikörper wurden mit unterschiedlichen Konzentration (0 µg/ml bis 10 µg/ml) eingesetzt (Kontrollantikörper = Rituximab-Varianten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

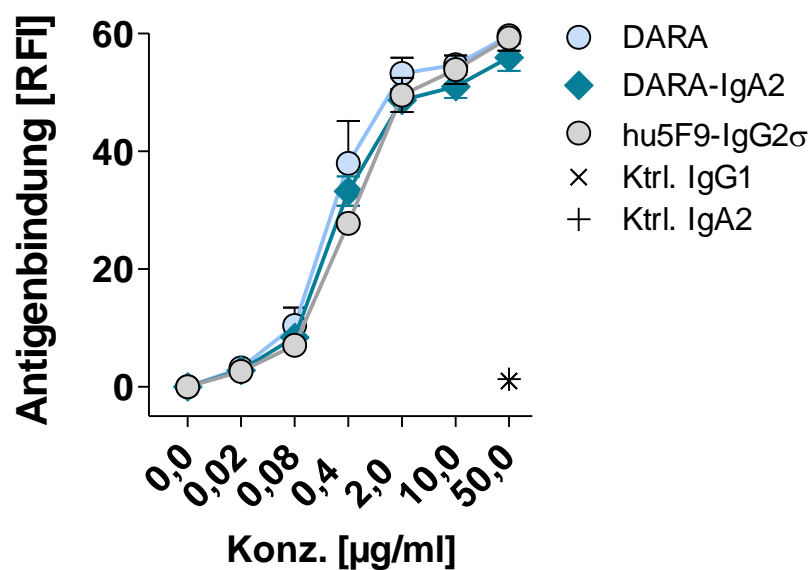


Abbildung 53: Bindung von Daratumumab-Varianten und hu5F9-IgG2 σ auf MOLT-13-Zellen. Die Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von DARA, DARA-IgA2 und hu5F9-IgG2 σ (Ktrl. IgG1 = CTX, Ktrl. IgA2 = CTX-IgA2) auf MOLT-13-Zellen wurde mittels indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Detektion dienen FITC-konjugierte

Abb. 53 ff.

anti-human Kappa-Leichtkette F(ab')₂-Fragmente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Experimente. RFI = relative Fluoreszenzintensität.

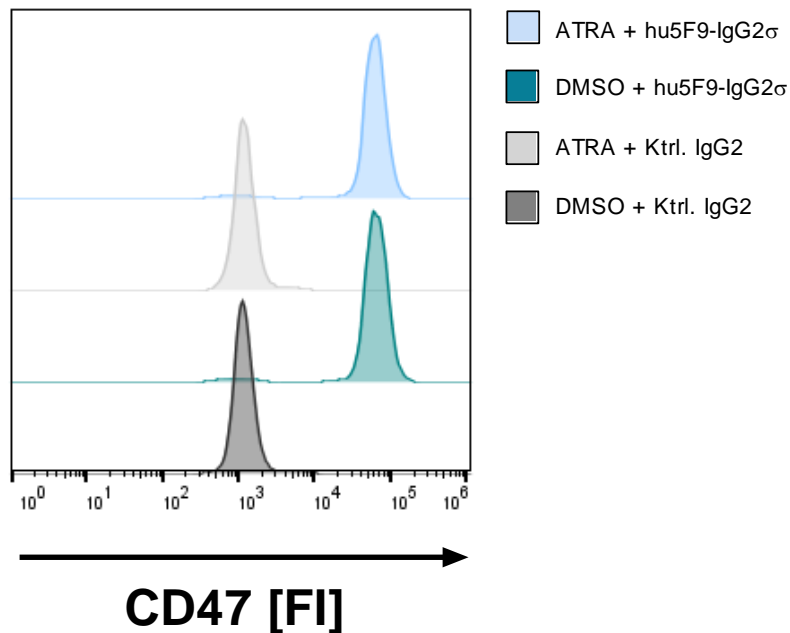


Abbildung 54: Bindung von hu5F9-IgG2 σ an HSB-2-Zellen nach ATRA-Behandlung.

HSB-2-Zellen wurden für 72 h mit 1 μ M ATRA oder DMSO behandelt. Die Bindung von hu5F9-IgG2 σ (20 μ g/ml) wurde mit indirekter Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrollantikörper diente Panitumumab. Zur Detektion dienten FITC-konjugierte anti-human IgG-Fc F(ab')₂-Fragmente. Exemplarisch dargestellt sind die Histogramme eines repräsentativen Experiments. FI = Fluoreszenzintensität.

12. Eigene Publikationen

Lustig, M., Chan, C., Jansen, J. H. M., Bräutigam, M., Kölling, M. A., Gehlert, C. L., Baumann, N., Mester, S., Foss, S., Andersen, J. T., Bastian, L., Sondermann, P., Peipp, M., Burger, R., Leusen, J. H. W., Valerius, T. Disruption of the sialic acid/Siglec-9 axis improves antibody-mediated neutrophil cytotoxicity towards tumor cells. *Front. Immunol.* **14**, 1178817 (2023).

Baumann, N., Arndt, C., Petersen, J., Lustig, M., Rösner, T., Klausz, K., Kellner, C., Bultmann, M., Bastian, L., Vogiatzi, F., Leusen, J. H. W., Burger, R., Schewe, D. M., Peipp, M., Valerius, T. Myeloid checkpoint blockade improves killing of T-acute lymphoblastic leukemia cells by an IgA2 variant of daratumumab. *Front. Immunol.* **13**, 949140 (2022).

Chernyavska, M., Hermans, C. K. J. C., Chan, C., Baumann, N., Rösner, T., Leusen, J. H. W., Valerius, T., Verdurmen, W. P. R. Evaluation of immunotherapies improving macrophage anti-tumor response using a microfluidic model. *Organs-on-a-Chip.* **4**, 100019 (2022).

Zeller, T., Lutz, S., Münnich, I. A., Windisch, R., Hilger, P., Herold, T., Tahiri, N., Banck, J. C., Weigert, O., Moosmann, A., von Bergwelt-Baildon, M., Flamann, C., Bruns, H., Wichmann, C., Baumann, N., Valerius, T., Schewe, D. M., Peipp, M., Rösner, T., Humpe, A., Kellner, C. Dual checkpoint blockade of CD47 and LILRB1 enhances CD20 antibody-dependent phagocytosis of lymphoma cells by macrophages. *Front. Immunol.* **13**, 929339 (2022).

Chan, C., Lustig, M., Baumann, N., Valerius, T., van Tetering, G., Leusen, J. H. W. Targeting myeloid checkpoint molecules in combination with antibody therapy: A novel anti-cancer strategy with IgA antibodies? *Front. Immunol.* **13**, 932155 (2022).

Autenrieb, M.-P., Vogiatzi, F., Winterberg, D., Gelehrer, C. L., Lenk, L., Baumann, N., Wolf, S., Valerius, T., Peipp, M., Schewe, D. M. Modulation of Daratumumab efficacy by Decitabine in pediatric T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Klin. Pädiatr.*, **234**(03), 184-185 (2022).

Baumann, N., Rösner, T., Jansen, J. H. M, Chan, C., Eichholz, K., Klausz, K., Winterberg, D., Müller, K., Humpe, A., Burger, R., Peipp, M., Schewe, D. M., Kellner, C., Leusen, J. H. W., Valerius, T. Enhancement of epidermal growth factor receptor antibody tumor immunotherapy by glutaminyl cyclase inhibition to interfere with CD47/signal regulatory protein alpha interactions. *Cancer Sci.* **112**(8), 3029-3040 (2021).

Evers, M., Rösner, T., Duenkel, A., Jansen, J. H. M., Baumann, N., Broeke, T. T., Nederend, M., Eichholz, K., Klausz, K., Reiding, K. R., Schewe, D. M., Kellner, C., Peipp, M., Leusen, J. H. W., Valerius, T. The selection of variable regions affects effector mechanisms of IgA antibodies against CD20. *Blood Adv.* **5**(19), 3807-3820 (2021).

Reichert, M., Bolik, J., Bergmann, J., Baumann, N., Mittrücker, H., Wunderlich, F. T., Rose-John, S., Schmidt-Arras, D. ADAM17-induced signaling pathways in the liver are essentially involved in DNA-damage and HCC formation. *Z. Gastroenterol.* **56**(01), E2-E89 (2018).

Bergmann, J., Müller, M., Baumann, N., Reichert, M., Heneweer, C., Bolik, J., Lücke, K., Gruber, S., Carambia, A., Boretius, S., Leuschner, I., Becker, T., Rabe, B., Herkel, J., Wunderlich, F. T., Mittrücker, H., Rose-John, S., Schmidt-Arras, D. IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, **65**(1), 89-103 (2016).

13. Kongressbeiträge

- **Cancer Immunotherapy CIMT, 2022** (Posterpräsentation)

CD47/SIRP α interference improves myeloid cell mediated killing of T-ALL cells by an IgA2 variant of daratumumab

Niklas Baumann, Christian Arndt, Judith Petersen, Marta Lustig, Thies Rösner, Katja Klausz, Christian Kellner, Lorenz Bastian, Jeanette H. W. Leusen, Renate Burger, Denis M. Schewe, Matthias Peipp, Thomas Valerius. 19th CIMT annual meeting, Abstract no.: 140.

- **Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie DGHO, 2022** (Vortrag)

Daratumumab as IgA2 in combination with CD47/SIRP α interference improves killing of T-ALL cells by macrophages and neutrophils

Niklas Baumann, Christian Arndt, Judith Petersen, Marta Lustig, Thies Rösner, Katja Klausz, Christian Kellner, Lorenz Bastian, Jeanette H. W. Leusen, Renate Burger, Denis M. Schewe, Matthias Peipp, Thomas Valerius. *Oncol. Res. Treat.*, 2022;45(Suppl. 2), Abstract no.: 236.

14. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Thomas Valerius für die Möglichkeit nach meiner Masterarbeit im Rahmen meiner Promotion weiter über dieses spannende Thema in seiner Arbeitsgruppe forschen zu dürfen, für die hervorragende Betreuung als auch Unterstützung bei der Arbeit.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Axel Scheidig für die Bereitschaft meine Dissertation zu betreuen und als Gutachter zur Verfügung zu stehen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Thies Rösner, der mir in der Anfangsphase meiner Promotion bis zu seinem Verlassen der Arbeitsgruppe mit Rat und Tat im Labor unterstützend zur Seite stand und an PD Dr. Renate Burger, die durchgängig eine große Hilfe vor allem beim Schreiben wissenschaftlicher Arbeiten war.

Zusätzlich möchte ich mich sowohl bei Marta Lustig und Maja Kowol als auch bei Prof. Dr. Matthias Peipp und seiner Arbeitsgruppe Dr. Katja Klausz, Dr. Dorothee Winterberg, Carina Gehlert, Ammelie Boje, Britta von Below, Anja Muskulus, Dr. Steffen Krohn, Jan Brdon, Thomas Theocharis und Alexander Jochimsen für die schöne Zeit im Labor, all die Unterstützung und das wunderbare Arbeitsklima im Dr. Mildred-Scheel-Haus bedanken.

Ferner danke ich unserern Kooperationspartnern Prof. Dr. Jeanette H. W. Leusen aus dem Universitätsklinikum Utrecht, Dr. Bastian Lorenz aus dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Kiel, Dr. Oliver Valerius aus der Georg-August-Universität Göttingen und deren Arbeitsgruppen für die tolle Zusammenarbeit, die ein großer Gewinn für meine Promotion waren.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meiner Partnerin Celine und meinen Freunden, die immer für mich da sind, für die mentale Unterstützung, die aufheiternden Worte und natürlich das Korrekturlesen.

VIELEN DANK!

15. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Niklas Baumann, geboren am 25.06.1992 in Bad Segeberg, an Eides statt, dass diese Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe, abgesehen von Ratschlägen meiner Betreuer und meiner sonstigen akademischen Lehrer, von mir verfasst wurde und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche ausgewiesen wurden. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Teile der Arbeit wurden im Laufe der Dissertation in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit als Ganzes ist unveröffentlicht. Ferner ist die Arbeit unter den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt worden. Ein akademischer Grad wurde nicht entzogen.

(Ort, Datum)

Niklas Baumann