

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Strategien zur Optimierung der Adapter-CAR-NK-92-
basierten Immuntherapie am Beispiel des
Neuroblastoms**

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

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

vorgelegt von

Jung, Gustav Bela

2022

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Handgretinger
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. S. Beer-Hammer
Tag der Disputation:	22.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Neuroblastom	1
1.1.1 Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2 Therapie	2
1.2 Immuntherapie.....	3
1.2.1 Grundlagen der Immuntherapie.....	3
1.2.2 Immuntherapie des Neuroblastoms.....	4
1.3 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs)	6
1.3.1 Aufbau und Funktion eines CARs.....	6
1.3.2 CAR-basierte Immuntherapie	7
1.3.3 Adapter-CAR System	10
1.4 Herausforderungen der CAR-basierten Immuntherapie bei soliden Tumoren	11
1.4.1 Tumormikromilieu.....	11
1.4.2 Immunsuppressive Wirkung von TGF β	11
1.4.3 Therapeutische Blockade von TGF β	12
1.5 Sicherheitsaspekte CAR-basierter Immuntherapie	12
1.5.1 Nebenwirkungen der CAR-basierten Immuntherapie	12
1.5.2 Kontrollmöglichkeiten CAR-modifizierter Immunzellen	13
1.6 Ziel dieser Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Adapter-CAR-Konstrukte	15
2.1.2 Zelllinien	16
2.1.3 Zellkulturmedien und Puffer.....	18
2.1.4 Antikörper	19
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.7 Geräte	24
2.1.8 Computerprogramme	26
2.2 Methoden.....	27

2.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	27
2.2.2	Viabilitätsassay (Trypanblau-Vitalfärbung)	28
2.2.3	Viabilitätsassay (MTS-Test).....	29
2.2.4	Durchflusszytometrie	30
2.2.5	Zytotoxizitätsassay (Calcein-Release-Test)	32
2.2.6	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Identifizierung und Evaluierung potenzieller Zielantigene für die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie des Neuroblastoms	36
3.1.1	FACS-basierte Charakterisierung der Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien	36
3.1.2	Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen	37
3.1.3	Korrelation zwischen AdCAR-NK-92-vermittelter spezifischer Lyse und Antigenexpression	40
3.2	Untersuchung der Auswirkungen von TGF β auf AdCAR-NK-92-Zellen	41
3.2.1	Bestimmung der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β oder dem TGF β Rezeptor-1-Inhibitor Galunisertib.....	41
3.2.2	FACS-basierte Charakterisierung des Rezeptorprofils der Adapter-CAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β	43
3.2.3	Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β	47
3.2.4	Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib	52
3.3	Untersuchung des Effekts von Bestrahlung auf AdCAR-NK-92-Zellen ..	55
3.3.1	Bestimmung der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy	55
3.3.2	Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10Gy	57
3.4	Untersuchungen zur pharmakologischen Kontrolle der AdCAR-Funktionalität	59
3.4.1	Bestimmung der Viabilität und Proliferation von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib ..	59
3.4.2	FACS-basierte Charakterisierung der Adapter-CAR-Expression in Gegenwart von Dasatinib	61
3.4.3	Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib	62
4	Diskussion	65
4.1	Eigenschaften der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie und Funktionstestung am Beispiel des Neuroblastoms	65

4.1.1	Eigenschaften der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie.....	65
4.1.2	Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien	67
4.1.3	Zytotoxizität von Adapter-CAR-NK-92-Zellen am Beispiel des Neuroblastoms	68
4.2	Einfluss von TGF β auf die Zytotoxizität von Adapter-CAR NK-92 Zellen und therapeutische Blockade mit Galunisertib	69
4.3	Bestrahlung mit 10 Gy reduziert die Viabilität und die Zytotoxizität von Adapter-CAR NK-92 Zellen.....	72
4.4	Pharmakologische Kontrolle der Adapter-CAR-Funktion mit Dasatinib .	74
4.5	Ausblick	76
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	80
7	Erklärung zum Eigenanteil	93
8	Anhang	94
8.1	Tabellen der Calcein-Release-Tests.....	94
8.2	Tabellen der MTS-Tests	103
8.3	Tabellen der Trypanblau-Vitalfärbungen.....	104
9	Danksagung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chimäre Antigenrezeptoren (CARs): Aufbau und Generationen. ...	7
Abbildung 2: Funktionsweise der AdCAR-NK-92-Zellen.	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der lentiviralen Transferplasmide.	16
Abbildung 4: Calcein-Release-Tests mit Adapter-CAR-NK-92-Zellen.	39
Abbildung 5: Korrelation zwischen AdCAR-NK-92-vermittelter spezifischer Lyse und MFI-Wert.	40
Abbildung 6: Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β oder Galunisertib.	42
Abbildung 7: Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit 10 ng/ml TGF β	49
Abbildung 8: Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit 50 ng/ml TGF β	51
Abbildung 9: Calcein-Release-Tests der Adapter-CAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib.	54
Abbildung 10: Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.	56
Abbildung 11: Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.	58
Abbildung 12: Viabilität und Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.	60
Abbildung 13: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib.	63
Abbildung 14: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92 Zellen nach Vorinkubation mit Dasatinib.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorassoziierte Antigene mit Expression auf humanen Neuroblastomen.....	5
Tabelle 2: Zellkulturmedien.....	18
Tabelle 3: Zellkulturzusätze.....	18
Tabelle 4: Puffer.....	18
Tabelle 5: Fluorochrom-markierte Antikörper.....	19
Tabelle 6: Isotyp-Antikörper.....	20
Tabelle 7: Biotinylierte Antikörper.....	21
Tabelle 8: Reagenzien.....	22
Tabelle 9: Substanzen.....	22
Tabelle 10: Assays.....	22
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 12: Elektronische Geräte.....	24
Tabelle 13: Pipetten.....	25
Tabelle 14: Computerprogramme.....	26
Tabelle 15: Durchflusszytometrische Analyse der Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien.....	37
Tabelle 16: Durchflusszytometrische Analyse von NK-Zell-Rezeptoren und Oberflächenantigenen auf AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β ... 46	46
Tabelle 17: Durchflusszytometrische Analyse der AdCAR-Expression der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.....	61
Tabelle 18: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen.....	94
Tabelle 19: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TGF β	95
Tabelle 20: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit 10 ng/ml TGF β	96
Tabelle 21: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit 50 ng/ml TGF β	97
Tabelle 22: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit 50 ng/ml TGF β	98

Tabelle 23: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib.	99
Tabelle 24: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.	100
Tabelle 25: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib.	101
Tabelle 26: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Vorinkubation mit Dasatinib.	102
Tabelle 27: Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β oder Galunisertib.	103
Tabelle 28: Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.	104
Tabelle 29: Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.	104
Tabelle 30: Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.	105

Abkürzungsverzeichnis

AdCAR	Adapter-CAR
ADCC	Antikörper-abhängige Zellvermittelte Zytotoxizität (<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ALK	Anaplastische Lymphomkinase (<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>) alias CD246
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bAK	Biotinylierter Antikörper
Bzw.	Beziehungsweise
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (<i>Cluster of differentiation</i>)
CLS	<i>Cell Line Services</i>
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CPCS	<i>Center for Pediatric Clinical Studies</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
E:Z	Effektor- zu Zielzellverhältnis
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FITC	Fluoreszenz-Isothiocyanat

FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward scatter</i>)
GD2	Gangliosid G2
GlutaMAX	Dipeptid aus L-Alanin und L-Glutamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte-macrophage stimulating factor</i>)
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>Good manufacturing practice</i>)
IGF-1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (<i>Insulin like growth factor receptor 1</i>) alias CD221
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
INRGSS	Internationales Neuroblastom Risikogruppen Staging System
INSS	Internationales Neuroblastom Staging System
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
L1CAM	Neurales Zelladhäsionsmoleküle L1 (<i>Neural cell adhesion molecule L1</i>) alias CD171
Lck	Lymphozyten-spezifischen Protein-Tyrosinkinase
LK	Leichtketten
LNGFR	Niedrigaffiner Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (<i>Low affinity nerve growth factor receptor</i>) alias CD271
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCAM	Melanom-Zelladhäsionsmolekül (<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>) alias CD146
MEM alpha	<i>Minimum Essential Medium alpha</i> (Medium)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
M. Sc.	Master of Science
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium]
MTA	Medizinisch-technischer Assistent
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i>)

PE	Phycoerythrin
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom-positiv
PPZ	Prozent Positive Zellen
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Medium)
scFv	Variables Einzelketten-Fragment (<i>Single-chain variable fragment</i>)
SK	Schwerketten
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side scatter</i>)
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor-β-1 (<i>Transforming growth factor β 1</i>)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)

SI-Einheiten, SI-Präfixe und zum Gebrauch mit dem SI zugelassene Einheiten

°C	Celsius
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalkraft
Gy	Gray
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Meter
m	Milli-
min	Minute(n)
mol	Mol
μ	Mikro-
n	Nano-
s	Sekunde(n)
U	Internationale Einheit

1 Einleitung

1.1 Neuroblastom

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Neuroblastome sind die häufigsten soliden extrakraniellen Tumore im Kindesalter und betreffen eines von 6000 Kindern unter 18 Jahren (Erdmann et al., 2020). In Deutschland stellen Neuroblastome mit einer relativen Häufigkeit von 5,5 % nach malignen hämatologischen Erkrankungen und ZNS-Tumoren die dritthäufigste Ursache maligner Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar und sind für 9,6 % aller Todesfälle im Rahmen kindlicher Krebserkrankungen verantwortlich (Erdmann et al., 2020). Das Neuroblastom ist ein maligner embryonaler Tumor und entsteht aus undifferenzierten, neuro-ektodermalen Zellen der Neuralleiste (Schwab et al., 2003). Neuroblastome können sich in allen Bereichen des sympathischen Nervensystems manifestieren, treten aber meist primär in der Nebenniere (47 %), abdominal bzw. retroperitoneal (24 %) oder thorakal (15 %) auf (Maris et al., 2007; Vo et al., 2014). Sie gelten als unberechenbar, da unterschiedliche Verläufe mit spontaner Regression, Differenzierung oder Progression und Metastasierung möglich sind (Schwab et al., 2003). Die Diagnose eines Neuroblastoms wird bei Vorliegen einer histopathologischen Diagnose mit immunhistochemischer Untersuchung von Tumorgewebe oder bei Nachweis eindeutiger Tumorzellen im Knochenmarkpunktat und gleichzeitiger Erhöhung von Katecholaminen oder deren Metaboliten in Serum oder Urin gestellt (Brodeur et al., 1993).

Um den vielfältigen Verlaufsformen gerecht zu werden, wurden Algorithmen entwickelt, mit denen die Neuroblastom-Erkrankung des Patienten einem Stadium zugeteilt werden kann: Verwendet werden das internationale Neuroblastom Staging System (INSS), bei dem die postoperative Resektabilität eine Rolle spielt, und das internationale Neuroblastom Risikogruppen Staging System (INRGSS), das auf radiologischen bild-definierten Risikofaktoren aufbaut und studienübergreifend präoperativ eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet (Brodeur et al., 1993; Monclair et al., 2009; Øra and Eggert, 2011). Anhand des Tumorstadiums nach INRGSS und weiteren prognostischen Faktoren, unter

anderem dem Patientenalter und einer Amplifikation des MYCN-Onkogens, werden Patienten einer von vier Risikogruppen des internationalen Neuroblastom-Risikogruppen-Klassifikationssystems zugeordnet (Cohn et al., 2009).

1.1.2 Therapie

Das therapeutische Vorgehen beim Neuroblastom reicht von beobachtendem Abwarten bis zu multimodaler Maximaltherapie mit Chemotherapie, Chirurgie und Radiotherapie und hängt von der Zuordnung in die entsprechende Risikogruppe ab (Maris et al., 2007).

Bei Patienten mit geringem und mittlerem Risiko ist die Prognose günstig und selbst mit reduzierter Therapie wurden progressionsfreie Fünfjahres-Überlebensraten von größer als 85 % erreicht (Baker et al., 2010; Rubie et al., 2011; Strother et al., 2012). Die Therapie der Patienten in der Hochrisikogruppe ist unterteilt in die drei Phasen Induktion, Konsolidierung und Aufrechterhaltung und erstreckt sich über einen Zeitraum von etwa 18 Monaten (Smith and Foster, 2018). Die Induktions-Polychemotherapie dient der Reduktion des Primärtumors und der Elimination von Metastasen und verhilft zu besseren Bedingungen für die chirurgische Resektion des Tumors (Tolbert and Matthay, 2018). Die Konsolidierungstherapie zielt darauf ab, das verbliebene Tumorgewebe zu eliminieren und besteht aus hochdosierter Chemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation und Radiotherapie (Smith and Foster, 2018). In der Aufrechterhaltungsphase werden die Patienten mit Isoretinoin, Zytokinen und dem monoklonalen Antikörper Dinutuximab (ch14.18) gegen das tumorassoziierte Gangliosid G2 (GD2) behandelt, um einen Rückfall durch minimale Resterkrankung zu verhindern (Yu et al., 2010; Pinto et al., 2015). Obwohl sich die Überlebenschance von Hochrisikopatienten seit den 1980er Jahren verbessert hat (Berthold et al., 2017), geht der Einschluss von 36,1 % aller Neuroblastom-Patienten in die Hochrisikogruppe trotz intensiver Therapie mit einer ungünstigen Prognose und einer Fünfjahresrate progressionsfreien Überlebens von kleiner als 50 % einher (Cohn et al., 2009; Valteau-Couanet et al., 2014). Dies unterstreicht den Bedarf neuer Therapieoptionen.

1.2 Immuntherapie

1.2.1 Grundlagen der Immuntherapie

Im Hinblick auf die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung maligner Erkrankungen präsentierten *Burnet et al.* 1957 die Theorie der Immunüberwachung, der zufolge das Immunsystem in der Lage ist, gegen maligne entartete Zellen vorzugehen (Burnet, 1957; Mittal et al., 2014). Die Erkennung und Elimination entarteter Zellen durch angeborenes und adaptives Immunsystem führen dabei zu einem mehrphasigen Prozess, in dem Immunevasions-Mechanismen der Tumorzellen und Selektion durch das Immunsystem zusammenwirken, so dass am Ende nur diejenigen Tumorzellen überleben und proliferieren können, die nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden (Schreiber et al., 2011). Dieser Prozess wird als Immun-Editierung bezeichnet und beschreibt, dass sich das Immunsystem nicht nur hemmend, sondern auch selektiv formend und fördernd auf die Tumorprogression auswirken kann (Mittal et al., 2014).

Das Ziel der Immuntherapie maligner Erkrankungen besteht darin, das Immunsystem des Erkrankten gezielt zu beeinflussen, um es bei der Bekämpfung der Krebserkrankung zu unterstützen (Yousefi et al., 2017). Grundsätzlich existieren zwei unterschiedliche Strategien der Immuntherapie von Krebserkrankungen (Morandi et al., 2018). Aktive Immuntherapieformen wie Tumorstoffimpfung und Immun-Checkpoint-Inhibitoren stimulieren das Immunsystem des Erkrankten und lösen eine Immunantwort aus, die zur Elimination der Tumorzellen führt (Rice et al., 2008; Pardoll, 2012; Galluzzi et al., 2014). Im Gegensatz dazu werden bei passiver Immuntherapie immunmodulatorische Substanzen wie Zytokine oder monoklonale Antikörper (mAKs) und Immunzellen wie T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eingesetzt, die bereits über intrinsische antineoplastische Eigenschaften verfügen (Weiner, 2007; Humphries, 2013; Morandi et al., 2018). Die Wahl der geeigneten Immuntherapie und der therapeutische Erfolg hängen maßgeblich von der Immunogenität des Tumors und damit von der Expression und Präsentation von tumorassoziierten Antigenen (TAAs) ab (Eggermont and Sugarbaker, 1990; Chen et al., 1994; Gray and Kohler, 2009). Ideale TAAs charakterisiert, dass sie von Tumorzellen

überexprimiert werden, nur geringfügig oder überhaupt nicht auf normalen Zellen exprimiert werden und eine Rolle in der Onkogenese spielen, so dass der Tumor einer Detektion durch das Immunsystem nicht durch Herabregulation der Expression des Antigens entgehen kann (Himoudi et al., 2008). Die Immuntherapie solider Tumore wird durch den Mangel tumorspezifischer Antigene, die Antigenheterogenität innerhalb des Tumors, die unterschiedlichen Tumorentitäten und die Immunevasions-Mechanismen der Tumore erschwert (Yilmaz et al., 2020).

1.2.2 Immuntherapie des Neuroblastoms

Im Hinblick auf das Neuroblastom bestehen die Herausforderungen der Immuntherapie unter anderem in der hohen Tumorerheterogenität und dem immunsuppressiven Tumormikromilieu (Jabbari et al., 2019). Allerdings wurden für die Therapie des Neuroblastoms bereits geeignete TAAs identifiziert, die teilweise in aktiven klinischen Studien getestet werden oder getestet wurden (Gray and Kohler, 2009; Kholodenko et al., 2018). Der zuvor erwähnte mAK Dinutuximab (ch14.18) richtet sich gegen das tumorassoziierte Antigen GD2, das nicht nur von Neuroblastomen überexprimiert wird sondern auch auf Melanomen, Retinoblastomen, Ewing-Sarkomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Gliomen, Osteo- und Weichteilsarkomen vorkommt (Schulz et al., 1984; Cheung et al., 1987; Nazha et al., 2020). Da GD2 im gesunden Gewebe nur geringfügig von Neuronen, Melanozyten der Haut und peripheren Nervenzellen exprimiert wird, ist es als Zielstruktur für die Immuntherapie des Neuroblastoms geeignet (Svennerholm et al., 1994; Yu et al., 2010). Der Einsatz des chimären mAK Dinutuximab (ch14.18) gegen das Antigen GD2 hat sich in klinischen Studien bewährt und stellt einen immuntherapeutischen Ansatz dar, der in Kombination mit Isoretinoin und den Zytokinen Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-2 (IL-2) mittlerweile Teil der Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms geworden ist (Handgretinger et al., 1995; Yu et al., 1998; Smith and Foster, 2018). Neben mAKs gegen GD2 existieren weitere immuntherapeutische Modalitäten, beispielsweise mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) modifizierte Immunzellen oder die selektive

Blockade bzw. Applikation von Zytokinen oder Tumorstimmungsimpfung, die für die Immuntherapie des Neuroblastoms infrage kommen (Jabbari et al., 2019). In dieser Arbeit wurden Neuroblastom-Zelllinien auf die Expression der Antigene CD146 (Melanom-Zelladhäsionsmolekül, MCAM), CD171 (Neurales Zelladhäsionsmolekül L1, L1CAM), CD221 (Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1, IGF-1R), CD246 (Anaplastische Lymphomkinase, ALK) und CD271 (Niedrigaffiner-Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor, LNGFR) untersucht, die teilweise bereits zur Immuntherapie des Neuroblastoms bzw. für CAR-basierte Immuntherapie eingesetzt wurden (Obu et al., 2019; Künkele et al., 2017; Park et al., 2015; Walker et al., 2017).

Tabelle 1: Tumorassoziierte Antigene mit Expression auf humanen Neuroblastomen.

Antigen	Kategorie	Expression auf Tumorgewebe	Expression auf Normalgewebe
CD146 (MCAM)	Zelladhäsionsmolekül (Shih, 1999)	Melanome, Sarkome (Shih, 1999), solide pädiatrische Tumore (Orentas et al., 2012)	Limitierte Expression auf Endothel, Myofibroblasten, Schwann-Zellen, glatte Muskelzellen, Mamma-Epithel, Ganglien-Zellen, Dendritische-Zellen, Trophoblast (Shih et al., 1998)
CD171 (L1CAM)	Zelladhäsionsmolekül (Brümmendorf et al., 1998)	Tumore neuroektodermalen Ursprungs: v.a. Neuroblastome (Rawnaq et al., 2012)	Limitierte Expression auf peripheren und zentralen Nervenzellen, Sammelrohr der Niere, Epidermis, Plazentaendothel (Rawnaq et al., 2012; Künkele et al., 2017)
CD221 (IGF-1R)	Tyrosinkinase-rezeptor (Ullrich et al., 1986)	Breite Expression auf Tumoren: u.a. solide pädiatrische Tumore (Kim et al., 2009) Hirntumore, HCC (Kolb et al., 2008)	Vermehrte Expression auf fetalen Geweben (Leroith et al., 1995), breite Expression auf Normalgewebe (Chitnis et al., 2008)
CD246 (ALK)	Tyrosinkinase-rezeptor (Iwahara et al., 1997)	Tumore neuroektodermalen Ursprungs: v.a. Neuroblastom (Dirks et al., 2002)	Vermehrte Expression auf fetalen Nervenzellen (Iwahara et al., 1997), wesentlich geringere Expression auf adulten Nervenzellen (Dirks et al., 2002)
CD271 (LNGFR)	Neurotrophin-rezeptor (Underwood and Coulson, 2008)	Melanome, Plattenepithelkarzinome, Astrozytome, Glioblastome (Vidal and Redmer, 2020), Neuroblastome (Morandi et al., 2012)	Vermehrte Expression auf fetalen Nervenzellen, wesentlich geringere Expression auf adultem Nervengewebe (Underwood and Coulson, 2008)

1.3 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs)

1.3.1 Aufbau und Funktion eines CARs

CARs sind rekombinante Rezeptoren, mit denen die Spezifität und die Aktivierung von Immunzellen gesteigert werden kann (Gross et al., 1989; Eshhar et al., 1993). Sie bestehen aus einer extrazellulären Erkennungsdomäne, die über eine Transmembran-Domäne mit der intrazellulären Signaldomäne verbunden ist (Yu et al., 2017). Die extrazelluläre Domäne dient der Erkennung von Tumor-Antigenen und wird von einem modifizierten variablen Einzelketten-Fragment (scFv) gebildet, das aus den variablen Domänen der Leichtketten und Schwereketten eines mAKs besteht (Eshhar et al., 1993; Mehta and Rezvani, 2018). Intrazellulär enthalten CARs die Domäne CD3 ζ zur Aktivierung der Effektorfunktion und kostimulatorische Domänen wie CD28, OX40 oder 4-1BB, die Aktivierung, Überleben, Proliferation und Zytokin-Sekretion der CAR-modifizierten Immunzelle verstärken (Finney et al., 2004; Yu et al., 2017). Abhängig von Vorkommen und Anzahl der kostimulatorischen Domänen werden CARs unterschiedlichen Generationen zugeteilt (Yu et al., 2017). Es existieren verschiedene gentechnische Verfahren, um Immunzellen mit dem CAR-Transgen auszustatten (Mehta and Rezvani, 2018). Im Gegensatz zur Transduktion mit einem retroviralen oder lentiviralen Vektor, die zu einer permanenten Expression des CARs führt, wird bei der mRNA-Transfektion mithilfe von Elektroporation nur eine vorübergehende Expression erreicht (Boissel et al., 2012; Mehta and Rezvani, 2018).

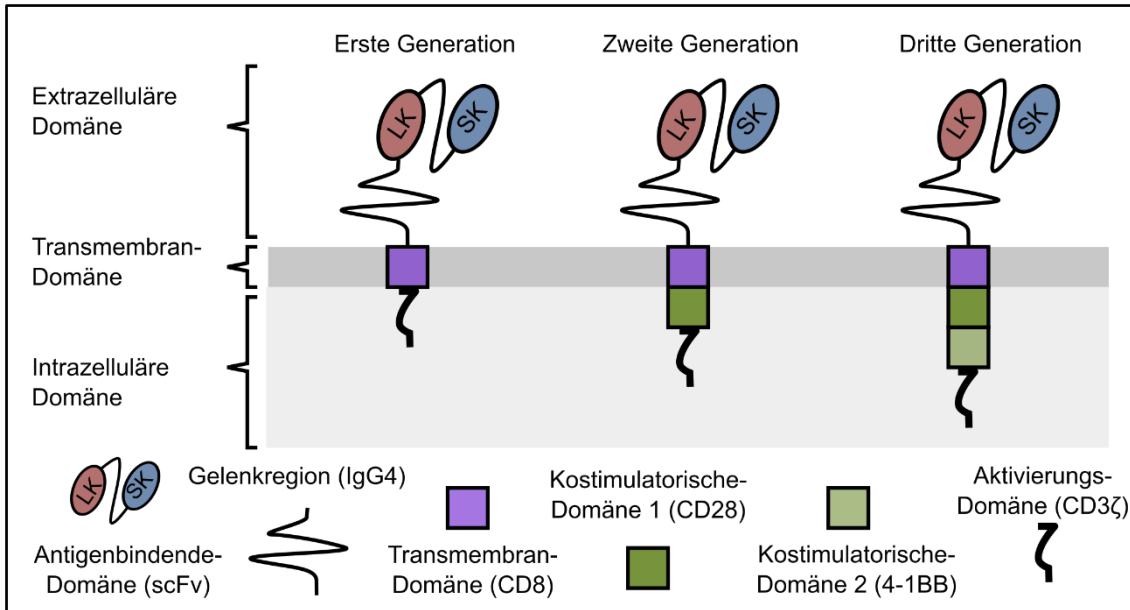


Abbildung 1: **Chimäre Antigenrezeptoren (CARs): Aufbau und Generationen.**

CARs bestehen aus einer extrazellulären Antigenerkennungs-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Signal-Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einem scFv mit den variablen Regionen der Leichtketten (LK) und Schwerketten (SK) eines mAK und ist über die Gelenkregion mit der Transmembran-Domäne verbunden. Die intrazelluläre Signaldomäne dient der Zellaktivierung. CARs der zweiten und dritten Generation enthalten zusätzlich eine bzw. zwei kostimulatorische Domänen. Eigene Darstellung in Anlehnung an Chang and Chen (2017).

1.3.2 CAR-basierte Immuntherapie

1.3.2.1 CAR-T-Zellen und CAR-NK-Zellen

Mit dem Ziel der antineoplastischen Immuntherapie wurden CARs zunächst im Hinblick auf T-Zellen entwickelt, da CARs im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor nicht MHC-restringiert sind und T-Zellen in die Lage versetzen, ein breiteres Antigenpektrum auf Tumorzellen zu erkennen, welches neben Proteinen auch Kohlenhydrate und Ganglioside umfasst (Chmielewski et al., 2014; Fesnak et al., 2016; Yu et al., 2017). Aktuell werden zahlreiche CAR-basierte Immuntherapien mit T-Zellen und NK-Zellen in präklinischen und klinischen Studien validiert (Yu et al., 2017; Hu et al., 2018). Die CAR-T-Zell Produkte Tisagenlecleucel und Axicabtagene-ciloleucel, bei denen es sich um gegen CD19 gerichtete CARs der zweiten Generation handelt, wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika und der Europäischen Union bereits zur Behandlung definierter hämatologischer B-Zell Erkrankungen zugelassen (Vitale and Strati, 2020).

1.3.2.2 CAR NK-92 Zellen

Neben T-Zellen und NK-Zellen werden auch NK-92-Zellen in der CAR-basierten Immuntherapie eingesetzt, da sie über günstige Eigenschaften verfügen und von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) bereits für klinische Phase-1- und Phase-2-Studien zugelassen wurden (Zhang et al., 2019).

Grundsätzlich entstammt die humane NK-Zelllinie NK-92 dem Non-Hodgkin Lymphom eines 50 Jahre alten Patienten (Gong et al., 1994). NK-92-Zellen wachsen und proliferieren IL-2 abhängig und sind aktivierten NK-Zellen phänotypisch und funktionell ähnlich (Gong et al., 1994; Maki et al., 2001). Charakterisiert wird die NK-92-Zelllinie durch Expression von CD56^{bright} und CD2 bei fehlender Expression von CD3, CD8 und CD16 (Maki et al., 2001). Analog zu NK-Zellen exprimieren auch NK-92-Zellen aktivierende und inhibitorische Rezeptoren, die ihre zytotoxische Aktivität regulieren (Maki et al., 2001).

Im Hinblick auf diese Arbeit waren die folgenden NK-Zell-Rezeptoren von besonderem Interesse: Die Rezeptoren CD226 (DNAM-1), CD314 (NKG2D), NKp80 und die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren CD335 (NKp46), CD336 (NKp44) und CD337 (NKp30) wirken aktivierend auf NK-Zellen (Morvan and Lanier, 2016; Bryceson et al., 2006), während die Rezeptoren CD85j (ILT-2), CD159a (NKG2A), CD161 (NKR-P1A) und die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) CD158a (KIR2DL1), CD158b1/2 (KIR2DL2/3) und CD158e/k (KIR3DL1/2) inhibitorisch wirken (Lanier, 2004; Campbell and Hasegawa, 2013). Die Wirkung der Rezeptoren CD94 (KLRD1) und CD244 (2B4) kann abhängig vom Dimerisationspartner (CD94) bzw. dem Zusammenwirken der zytoplasmatischen Domäne mit spezifischen Adaptermolekülen (CD244) aktivierend oder inhibitorisch ausfallen (Lanier, 2004; Agresta et al., 2018). Darüber hinaus gibt die Expression weiterer Oberflächenantigene wie CD25 (IL2R α), CD62L (L-Selectin) und CD69 Aufschluss über proliferatives Potential (CD25), Polyfunktionalität (CD62L) und Zytotoxizität (CD69) (Clausen, 2003; Juelke et al., 2010).

Einige dieser Rezeptoren wie die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren CD337 (NKp30), CD335 (NKp46) und CD314 (NKG2D), die inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren CD159a (NKG2A) und CD85j (ILT2) sowie CD244 (2B4) sind

bekanntermaßen auch im Rezeptorprofil von NK-92-Zellen enthalten (Maki et al., 2001). Abgesehen von CD158d (KIR2DL4), der sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale vermitteln kann, werden keine inhibitorischen KIRs auf NK-92-Zellen exprimiert (Maki et al., 2001; Faure and Long, 2002).

Die Expression der zytotoxischen Effektormoleküle TRAIL, TNF α und FasL zeigt an, dass NK-92-Zellen auch über diese Signalwege Zytotoxizität vermitteln können (Maki et al., 2001). Da NK-92-Zellen kein CD16 exprimieren, fehlt ihnen die Fähigkeit, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) zu induzieren (Suck et al., 2016). Ihr einzigartiges Rezeptorprofil, das aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, aber kaum inhibitorische Rezeptoren enthält, versetzt NK-92-Zellen in die Lage zytotoxisch gegenüber Tumorzelllinien und primären malignen Zellen zu wirken (Maki et al., 2001; Klingemann et al., 2016). Trotz mangelnder Expression der meisten inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren wurde demonstriert, dass NK-92-Zellen nicht zytotoxisch gegen hämatopoetische Stammzellen vorgehen und auch deren Funktion nicht kompromittieren (Klingemann et al., 1996; Yan et al., 1998).

Obwohl im Tiermodell nach mehrfacher Verabreichung von NK-92-Zellen und IL-2 kein Anwachsen der Zelllinie festgestellt werden konnte, werden NK-92-Zellen vor Infusion in Patienten mit 10 Gy bestrahlt, um die Entstehung eines sekundären Lymphoms zu verhindern (Yan et al., 1998; Tam et al., 1999; Zhang et al., 2017). Infusionen mit bestrahlten NK-92-Zellen von bis zu 10^{10} Zellen/m² wurden von Patienten gut toleriert und in klinischen Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom, Melanom oder Bronchialkarzinom wurden NK-92-Zellen mit therapeutischem Nutzen bei geringem Nebenwirkungsprofil eingesetzt (Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013). Neben ihrer Zytotoxizität besitzen NK-92-Zellen weitere Eigenschaften, die sie attraktiv für CAR-basierte Immuntherapie machen (Klingemann et al., 2016). Im Gegensatz zu autologen T-Zellen und allogenen NK-Zellen kann die NK-92-Zelllinie unabhängig von Patienten oder Spendern in kurzer Zeit gemäß den Richtlinien guter Herstellungspraxis (GMP) in angemessener Qualität und Quantität für adoptive Immuntherapie expandiert und genetisch mit hoher Effizienz modifiziert werden (Tam et al., 2003; Klingemann and Martinson, 2004; Boissel et al., 2012).

1.3.3 Adapter-CAR System

Die Beschränkung der meisten CAR-basierten Immuntherapieansätze auf ein einzelnes Antigen als Zielstruktur ist anfällig für eine Immunevasion des Tumors und fördert das selektive Überleben von Tumorzellen, die nur geringe Mengen des Antigens exprimieren und einen möglichen Rückfall begünstigen können (Ruella et al., 2016; Darowski et al., 2019; Li and Chen, 2019). Eine Möglichkeit zur Bewältigung dieser Herausforderungen stellt der Einsatz universeller CARs dar (Darowski et al., 2019; Grote et al., 2020b). Diese CARs erkennen kein TAA als Zielstruktur, sondern binden an ein Adaptermolekül, das spezifisch an ein TAA bindet und für die Erkennung durch den CAR mit einem Signalmolekül markiert ist (Darowski et al., 2019). Adaptermoleküle können unterschiedlichster Natur sein, solange sie spezifisch an ein TAA binden und zur Erkennung durch den CAR mit einem Signalmolekül modifiziert werden können (Darowski et al., 2019). Die Verwendung eines universellen CAR-Systems in Verbindung mit markierten Adaptermolekülen ermöglicht es, sequentiell oder simultan multiple Tumor-Antigene als Zielstrukturen zu erkennen (Urbanska and Powell, 2012; Lohmueller et al., 2018).

Das in dieser Arbeit verwendete Adapter-CAR (AdCAR)-System ist ein universelles CAR-System, das mithilfe der Eigenschaften eines neuartigen scFv ein *Linker-Label-Epitope* genanntes Neo-Epitop erkennt (Seitz et al., 2017; European Patent Application EP3315511A1, 2016). Dieses Epitop entsteht durch Verbindung des endogenen Vitamins Biotin als Markierung (*label*) mit einem spezifischen Molekül als Verbinder (*linker*) und kann GMP-konform an geeignete Adaptermoleküle wie mAKs gebunden werden (Seitz et al., 2017; European Patent Application EP3315511A1, 2016). Vollständig charakterisiert wird das AdCAR-System im Rahmen des Patentantrages EP3315511A1. Die effektorzell-mediierte Lyse der Zielzellen folgt auf einen zweistufigen Erkennungsprozess, in dem biotinylierte Antikörper (bAKs) spezifisch an Antigene auf der Zielzelloberfläche binden und anschließend selbst von der AdCAR-modifizierten Immunzelle gebunden werden (Grote et al., 2020b).

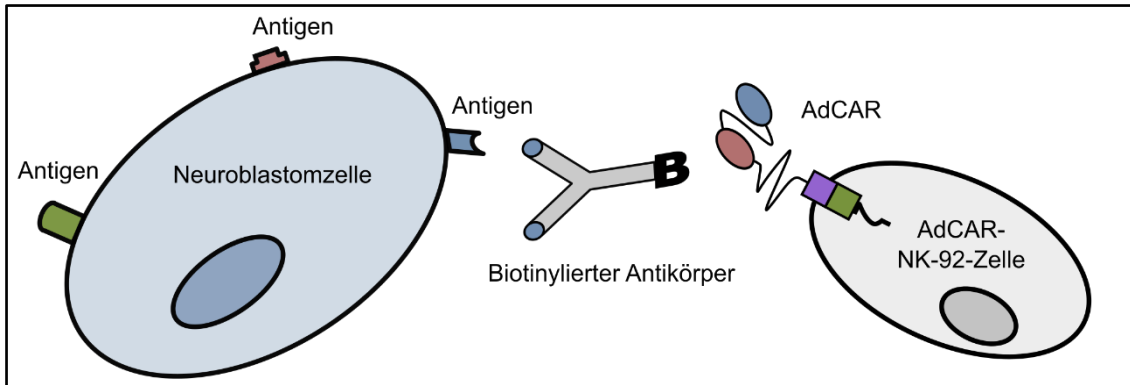


Abbildung 2: **Funktionsweise der AdCAR-NK-92-Zellen.**

NK-92-Zellen wurden mit einem AdCAR-Konstrukt transduziert. Der CAR bindet an ein Neoepitop bestehend aus Biotin im Kontext monoklonaler Antikörper. Der biotinylierte Antikörper bindet spezifisch an ein Antigen auf der Oberfläche der Neuroblastom-Zelle und stellt als Adapter die Verbindung zwischen Tumorzelle und AdCAR-NK-92-Zelle her. Nach Bindung induziert der CAR die Aktivierung der AdCAR-NK-92-Zelle und leitet die Lyse der Zielzelle ein. Eigene Darstellung in Anlehnung an Grote et al. (2020b).

1.4 Herausforderungen der CAR-basierten Immuntherapie bei soliden Tumoren

1.4.1 Tumormikromilieu

Auf dem Weg, die vielversprechenden Ergebnisse der CAR-basierten Immuntherapie bei hämatologischen Neoplasien auch bei soliden Tumoren zu erreichen, stellt unter anderem das immunsuppressive Tumormikromilieu solider Tumore eine Hürde dar (Chang and Chen, 2017; Yilmaz et al., 2020).

1.4.2 Immunsuppressive Wirkung von TGF β

Immunsuppressive Zytokine wie transformierender Wachstumsfaktor β -1 (TGF β) spielen eine Rolle im Tumormilieu vieler Tumorentitäten, unter anderem beim Neuroblastom (Massagué, 2008; Tran et al., 2017). Physiologisch ist TGF β an der Regulation zahlreicher Funktionen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Wundheilung beteiligt (Massagué, 2008). Der Signalweg von TGF β beginnt extrazellulär mit Bindung und Aktivierung der TGF β -Rezeptoren-1 und -2 zu einem Heterodimer, der seinerseits als Serin/Threonin-Kinase wirkt, die rezeptor-regulierten Proteine SMAD2 und SMAD3 phosphoryliert und zur Bildung eines Komplexes mit dem Mediator-Protein SMAD 4 anregt (Heldin et al., 1997; Yang and Moses, 2008). Dieser Komplex tritt daraufhin in den Zellkern ein und wirkt

als Transkriptionsfaktor (Yang and Moses, 2008). Im Kontext maligner Tumore wird TGF β von den Tumorzellen selbst, aber auch von regulatorischen T-Zellen, myeloiden Suppressorzellen und tumorassoziierten Makrophagen des Tumormikromilieus produziert und wirkt sich fördernd auf die Tumorgenese aus (Massagué, 2008; Vanichapol et al., 2018). Außerdem hat TGF β weitreichende inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem und beeinträchtigt die Funktion zahlreicher Immunzellen (Letterio, 2000; Thomas and Massagué, 2005). Im Hinblick auf primäre NK-Zellen induziert TGF β eine Herunterregulation aktivierender Rezeptoren und eine Inhibition der Proliferation und der Zytotoxizität (Lee et al., 2014).

1.4.3 Therapeutische Blockade von TGF β

Therapeutische Strategien zur Hemmung der Effekte von TGF β setzen auf unterschiedlichen Ebenen des Signalwegs an; dabei stellen die Synthese des Liganden, die Interaktion von Ligand und Rezeptor oder die intrazelluläre Signalkaskade mögliche Zielstrukturen dar (Neuzillet et al., 2015).

Die niedermolekulare Verbindung Galunisertib (LY2157299) bindet antagonistisch an den TGF β -Rezeptor-1 und wirkt als Inhibitor der Kinase-Domäne durch Hemmung der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 und konsekutive Unterbrechung der intrazellulären Signalkaskade von TGF β (Sawyer et al., 2003; Bueno et al., 2008; Serova et al., 2015). In präklinischen Studien konnte die durch TGF β supprimierte Zytotoxizität von NK-Zellen durch Galunisertib wiederhergestellt werden (Tran et al., 2017; Otegbeye et al., 2018). Die Verträglichkeit von Galunisertib wurde bereits in klinischen Phase-I-Studien an Patienten mit einer fortgeschrittenen malignen Erkrankung nachgewiesen (Rodón et al., 2015; Fujiwara et al., 2015).

1.5 Sicherheitsaspekte CAR-basierter Immuntherapie

1.5.1 Nebenwirkungen der CAR-basierten Immuntherapie

Die gesteigerte antineoplastische Wirksamkeit von Immunzellen durch CAR-Modifikation geht mit vermehrter Toxizität und erhöhtem Bedarf an Kontrollmöglichkeiten einher (Zhang et al., 2017; Sun et al., 2018). Besonders

hervorzuheben sind das Zytokin-Freisetzungssyndrom durch aktivierte CAR-T-Zellen und das Tumorlysesyndrom (Sun et al., 2018). Außerdem kann Zytotoxizität CAR-modifizierter Immunzellen gegenüber normalem Gewebe infolge mangelnder Tumor-Selektivität des eingesetzten Zielantigens oder durch Kreuzreaktivität des Antigen-erkennenden scFv des eingesetzten CARs entstehen (Sun et al., 2018).

1.5.2 Kontrollmöglichkeiten CAR-modifizierter Immunzellen

Eine Strategie zur Beherrschung dieser Nebenwirkungen und zur Verbesserung der Sicherheit CAR-basierter Immuntherapien ist es, das Überleben und die Funktion CAR-modifizierter Immunzellen durch Sicherheitsmechanismen kontrollierbar zu machen (Fesnak et al., 2016; Sun et al., 2018).

Mithilfe von Suizidgenen können CAR-exprimierende Immunzellen modifiziert werden, so dass sie nach Verabreichung einer Substanz, die den Suizidmechanismus der modifizierten Zellen induziert, selektiv eliminiert werden (Fesnak et al., 2016). Eine Möglichkeit CAR-modifizierte Immunzellen zu kontrollieren, ohne sie zu eliminieren, bieten aktivierende Moleküle, die separat von den CAR-modifizierten Immunzellen verabreicht werden, deren Anwesenheit aber obligat für die CAR-Funktion ist (Fesnak et al., 2016). Im Sinne eines pharmakologischen Schalters stellt der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib eine Option zur Kontrolle CAR-modifizierter Immunzellen dar (Mestermann et al., 2019). Dasatinib ist aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf die BCR-ABL-Kinase bereits als Erstlinien-Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph⁺) chronisch myeloischen Leukämie (CML) und der Ph⁺ akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) zugelassen (Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Im Kontext CAR-basierter Immuntherapie ist die reduzierte Phosphorylierung von CD3 ζ und ZAP70 infolge der Inhibition der Lymphozyten-spezifischen Protein-Tyrosinkinase (Lck) ausschlaggebend für den inhibitorischen Effekt von Dasatinib auf die CAR-Funktion (Karlsson et al., 2015; Mestermann et al., 2019).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die Adapter-CAR-NK-92-basierte Immuntherapie stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie maligner Tumore dar (Grote et al., 2020b). Ihre Stärken beruhen auf der Fähigkeit des Adapter-CAR-Systems, universelle Zielantigene auf kontrollierbare Weise zu erkennen und dem Potenzial von NK-92-Zellen, gemäß den Richtlinien guter Herstellungspraxis in angemessener Qualität und Quantität angereichert und mit einem CAR modifiziert zu werden (Tam et al., 2003; Seitz et al., 2017; Grote et al., 2020b).

Das Ziel dieser Arbeit war die Validierung und Optimierung der Adapter-CAR-NK-92-basierten Immuntherapie am Beispiel des Neuroblastoms im Hinblick auf Hürden bei der Therapie solider Tumore, die Beeinflussung ihrer Funktionalität durch Bestrahlung und die pharmakologische Beeinflussung der CAR-Funktion. Dafür wurden Neuroblastom-Zelllinien auf die Expression potenzieller TAAs untersucht. Im Rahmen einer Funktionstestung der AdCAR-NK-92-Zellen mit Neuroblastom-Zelllinien als Zielzellen wurden anschließend bAK gegen diese TAAs verwendet. Stellvertretend für immunsuppressive Zytokine im Tumormikromilieu solider Tumore wurde die Auswirkung von TGF β auf die Viabilität, das Rezeptorprofil und die Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen untersucht. Da die Bestrahlung mit 10 Gy als Sicherheitsmaßnahme aktuell eine Voraussetzung für die klinische Anwendung darstellt, wurde der Effekt von Bestrahlung auf die Viabilität und die Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen überprüft. Zuletzt wurde die pharmakologische Beeinflussung der CAR-Funktion von AdCAR-NK-92-Zellen durch Verwendung von Dasatinib im Sinne eines molekularen Schalters validiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Adapter-CAR-Konstrukte

In dieser Arbeit wurden AdCAR-NK-92-Zellen verwendet, die im Rahmen der Dissertation von M. Sc. Stefan Grote in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Sabine Schleicher in der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen generiert wurden.

Die Funktionsweise des Adapter-CAR-Systems beruht auf der Aktivierung von Immunzellen durch bAK, die als Adapter-Moleküle fungieren und Antigene spezifisch erkennen. Der Adapter-CAR (AdCAR) basiert auf den Eigenschaften eines neuartigen scFv und erkennt ein Neo-Epitop als Zielstruktur, das aus Biotin (auch als Vitamin B7 oder Vitamin H bezeichnet) gebunden an das Fc-Fragment eines monoklonalen Antikörpers besteht. Voraussetzung für die Lyse von Zielzellen durch Adapter-CAR NK-92 Zellen ist die spezifische Bindung von bAK an die entsprechende Zielstruktur auf der Zielzelloberfläche und die Bindung von AdCAR-NK-92 Zellen an den bAK (European Patent Application EP3315511A1, 2016).

In dieser Arbeit wurden AdCAR-NK-92 Zellen mit zwei verschiedenen AdCAR-Konstrukten verwendet. Die Evaluation potenzieller Antigene für die Neuroblastomtherapie und die Untersuchung der Auswirkungen von TGF β , Galunisertib und Bestrahlung wurden mit AdCAR-NK-92-Zellen durchgeführt, die ein AdCAR-Konstrukt der zweiten Generation enthalten. Dieses Konstrukt basiert auf dem scFv eines Maus-Antikörpers, enthält eine IgG4 Gelenkregion, eine CD8 Transmembran-Domäne, die ζ -Kette des CD3-Rezeptors als intrazelluläre Aktivierungsdomäne und CD28 als kostimulatorische Domäne. Eine verkürzte Form des hämatopoetischen Vorläuferantigens CD34 wurde als Markergen für die Selektion der AdCAR-transduzierten-NK-92-Zellen koexprimiert (Grote et al., 2020b).

Untersuchungen der pharmakologischen Kontrolle der CAR-Funktion wurden mit AdCAR-NK-92-Zellen mit einem AdCAR-Konstrukt der dritten Generation durchgeführt, dessen scFv von einem humanisierten Antikörper stammt und das

neben CD28 auch 4-1BB als kostimulatorische Domäne enthält. Bei diesem AdCAR-Konstrukt wird CD271 als Erkennungsmerkmal mit dem AdCAR koexprimiert. Beide Konstrukte wurden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland entwickelt und zur Verfügung gestellt.

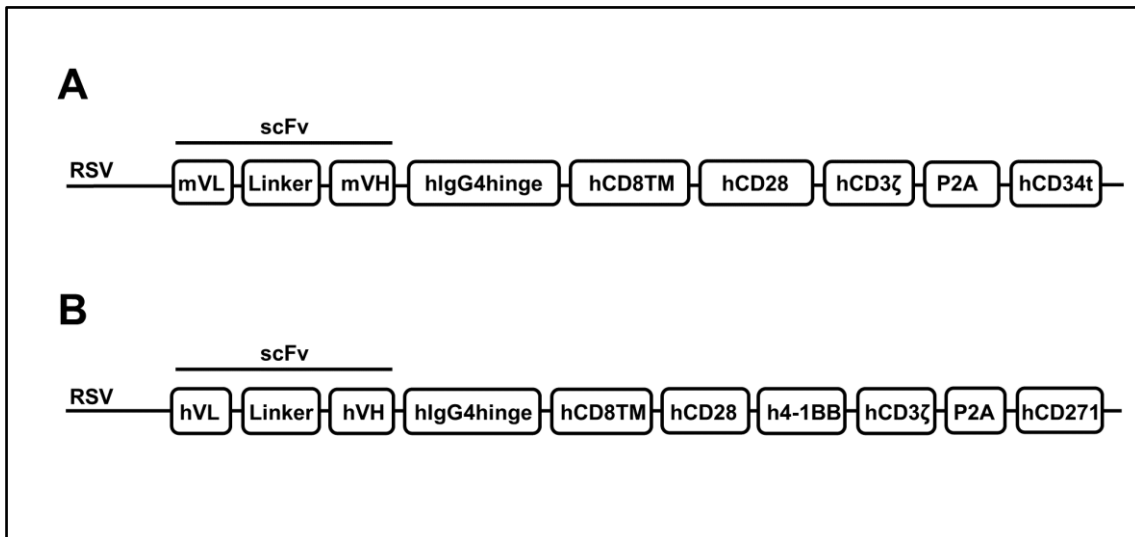


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der lentiviralen Transferplasmide.**

Plasmid **A** kodiert für das AdCAR Konstrukt der zweiten Generation, dessen scFv von einem Maus-Antikörper stammt und das CD28 als kostimulatorische Domäne und CD34 als Markergen enthält. Plasmid **B** kodiert für das AdCAR Konstrukt der dritten Generation, dessen scFv von einem humanisierten Antikörper stammt und das CD28 und 4-1BB als kostimulatorische Domänen und CD271 als Markergen enthält. Eigene Darstellung in Anlehnung an Grote et al. (2020b).

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 NK-92-Zelllinie

Die NK-92-Zelllinie stammt aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen Patienten mit rasch progredientem Non-Hodgkin-Lymphom und wurde 1992 etabliert (Gong et al., 1994). Die Zellen der NK-92-Zelllinie wurden bei der *American Type Culture Collection* (ATCC) erworben.

2.1.2.2 Neuroblastom-Zelllinien

IMR-32

Die Zelllinie IMR-32 entstammt dem abdominellen Tumor eines 13 Monate alten Jungen mit Neuroblastom. Sie wurde 1970 von *Tumilowicz et al.* etabliert

(Tumilowicz et al., 1970). und bei der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) erstanden.

Kelly

Die Zelllinie Kelly wurde aus dem Neuroblastom eines einjährigen Mädchens isoliert (Web-Expasy, 2012) und bei der *Cell Line Services* (CLS) GmbH erworben.

LAN-1

Seeger et al. etablierten die Zelllinie LAN-1 im Jahre 1972. Die Zellen stammen aus der Knochenmarksmetastase eines zweijährigen Jungen mit Neuroblastom im klinischen Stadium IV (*Seeger et al.*, 1977) und wurden bei der ECACC erworben.

LS

Die Zelllinie LS wurde 1989 aus Zellen der abdominellen Tumormasse eines 16 Monate alten Mädchens, bei dem ein Neuroblastom im Stadium III diagnostiziert wurde, etabliert und am Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, charakterisiert (*Rudolph et al.*, 1991). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger zur Verfügung gestellt.

SH-SY5Y

Die Zelllinie SH-SY5Y ist ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH, die 1970 von *Biedler et al.* aus der Knochenmarksbiopsie eines Neuroblastom-Patienten etabliert wurde (*Biedler et al.*, 1973; *Biedler et al.*, 1978). Die Zelllinie wurde bei der ECACC erworben.

SK-N-AS

Die Zellen der SK-N-AS Zelllinie entstammen der Knochenmarksmetastase eines achtjährigen Mädchens mit einem wenig differenzierten Neuroblastom im Stadium IV (*Sugimoto et al.*, 1984) und wurden bei der ECACC erstanden.

SK-N-BE

Biedler et al. etablierten die Zelllinie SK-N-BE(1) im Juni 1972. Die Zellen wurden im Rahmen einer Knochenmarksbiopsie bei einem Patienten mit Neuroblastom gewonnen (*Biedler et al.*, 1978) und ebenfalls bei der ECACC erworben.

2.1.3 Zellkulturmedien und Puffer

2.1.3.1 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien.

Medium	Hersteller
MEM alpha + GlutaMAX™ (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 + GlutaMAX™ (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3.2 Zellkulturzusätze

Tabelle 3: Zellkulturzusätze.

Zellkulturzusätze	Hersteller
Fötales Kälberserum (FCS), Hitze-inaktiviert	Thermo Fischer Scientific, Warham, USA
Antibiotika-Antimykotikum (100X)	Thermo Fischer Scientific, Warham, USA
Humanes rekombinantes TGF-β1 (TGFβ)	BioLegend, San Diego, USA
Humanes Interleukin-2 (IL-2), (Proleukin, Aldesleukin)	Novartis, Basel, Schweiz
Trypsin-EDTA (1X)	Thermo Fischer Scientific, Warham, USA

2.1.3.3 Puffer

Tabelle 4: Puffer.

Puffer	Hersteller
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (DPBS) 1x	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) 1x, pH 7,2	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Fluorochrom-markierte Antikörper.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Isotyp	Hersteller	Ref. Nummer
Biotin-PE	REA746	PE	IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-110-951
CD25 (IL2RA)	M-A251	FITC	Maus IgG1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	555431
CD34	AC136	PE	IgG2a	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-113-741
CD62L	DREG-56	APC	Maus IgG1	BioLegend, San Diego, USA	304810
CD69 (CLEC2C)	L78	APC	Maus IgG1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	340560
CD85j (LILRB1)	GHJ/75	PE	Maus IgG2b	BioLegend, San Diego, USA	333708
CD94 (KLRD1)	DX22	FITC	Maus IgG1	BioLegend, San Diego, USA	305504
CD158a (KIR2DL1)	HP-3E4	FITC	Maus IgM	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	556062
CD158b (KIR2DL2/3)	DX27	APC	IgG2a, K	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-617
CD158e/k (KIR3DL1/2)	5,133	PE	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-095-205
CD159a (NKG2A)	Z199	PE	Maus IgG2b	Beckmann Coulter, Brea, USA	IM3291U
CD161 (KLRB1)	DX12	PE	Maus IgG1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	340530
CD226 (DNAM-1)	TX25	FITC	Maus IgG1	BioLegend, San Diego, USA	337104
CD244 (NKR2B4)	DX26	FITC	Maus IgG2a	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	550815
CD271 (LNGFR)	ME20.4-1.H4	APC	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-113-418

CD314 (NKG2D)	BAT221	APC	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-673
CD335 (NKp46)	9E2	PE	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-607
CD336 (NKp44)	2,29	PE	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-480
CD337 (NKp30)	AF29-4D12	APC	Maus IgG1	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-484
NKp80	SD12	APC	Maus IgG1	BioLegend, San Diego, USA	346708

Tabelle 6: **Isotyp-Antikörper.**

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Ref. Nummer
Maus IgG1, K	MOPC-21	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	555751
Maus IgG1, K	MOPC-21	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	555909
Maus IgG1, K	IS5-21F5	PE	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-113-200
Maus IgG2a, K	MOPC-173	APC	BioLegend, San Diego, USA	400220
Maus IgG2a, K	G155-178	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	555573
Maus IgG2a	S43.10	PE	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-113-271
Maus IgG2b, K	MPC-11	PE	BioLegend, San Diego, USA	400314
Maus IgM, K	MM-30	FITC	BioLegend, San Diego, USA	401606

Tabelle 7: **Biotinylierte Antikörper.**

Antikörper	Klon	Hersteller	Ref. Nummer
CD146-Biotin	541-10B2	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-852
CD171-Biotin	555	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-100-702
CD200-Biotin (Samalizumab)	OX-104	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-096-817
CD221-Biotin	REA271	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-103-938
CD246-Biotin	REA425	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-112-579
CD271-Biotin	REA844	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-091-883
CD276*	HEK 5 1B3	Dr. Hans-Jörg Bühring, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland	-
EGFR* (Cetuximab)	-	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland	-
GD2* (Dinutuximab)	Ch14.18	United Therapeutics Corp, Silver Spring, USA	-

*Die Biotinylierung der Antikörper erfolgte durch Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, Deutschland.

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

2.1.5.1 Reagenzien

Tabelle 8: Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
Calcein Acetoxymethyl (Calcein-AM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid), anhydrous	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA-Lösung 0,05 M	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 37 % in H ₂ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100 10 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5.2 Substanzen

Tabelle 9: Substanzen.

Substanzen	Hersteller
Dasatinib	STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada
Galunisertib (LY2157299)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

2.1.5.3 Assays

Tabelle 10: Assays.

Assays	Hersteller
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypanblau 0,4 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Profissimo, Alufolie 33 m	dm, Karlsruhe, Deutschland
Einmalkanülen	100 Sterican® (0,90 x 70 mm, 20 G x 2,75")	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Flächendes- infektionsmittel	Descosept AF	Dr. Schumacher, Malsfeld, Deutschland
Gefäße	Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
	Falcon® Polystyrene Röhrchen mit rundem Boden (5 ml)	Corning® Falcon®, Corning, USA
	Eppendorf Gefäße mit Deckelverriegelung (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Handschuhe	Classic, Nitril, puderfrei, Medizinische Untersuchungshandschuhe	Abena, Aabenraa, Dänemark
Pipetten	Stripette ® Serolofische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Costar, Corning, USA
Pipettenspitzen	epT.I.P.S (0-20 µl, 20-300 µl, 50-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Pipettenspitzen PP oberflächenoptimiert (0,1-20 µl, 0-200 µl, 100-1250 µl)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
	Combitips® advanced, Dispenserspitzen (2,5 ml, 1 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zählkammern	C-Chip, Neubauer Improved	NanoEnTek, Seoul, Korea
Zellkulturflaschen	Cellstar® Zellkulturflaschen, TC- behandelt, Roter Filterschraubverschluss (250 ml, 75 cm ² ; 550 ml, 175 cm ²)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten	Cellstar® Zellkultur Mikroplatten 96 Vertiefungen, Polystyren, V-Boden, transparent	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
	Cellstar® Zellkultur Mikroplatten 96 Vertiefungen, Polystyren, F-Boden, transparent	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
	Cellstar® Zellkultur Mikroplatte 96 Vertiefungen, Polystyren, F-Boden, µClear®, schwarz	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.1.7 Geräte

Tabelle 12: Elektronische Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bestrahlungsgerät	Gammacell 1000 elite	Nordion, Ottawa, Kanada
Brutschrank	HERA cell	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Kühl- und Gefrierschränke	Premium NoFrost (4 °C, -20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
	Profi Line (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
	-86C Gefrierschrank (-80 B21°C)	Forma Scientific, Waltham, USA
Multimode Mikroplatten-basiertes Spektrophotometer	Spark	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroplatten-Spektrophotometer	ELx800	BioTek, Winooski, USA
Mikroskop	Wilovert	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
	IX50	Olympus, Shinjuku, Japan
Schüttel- und Mischgerät	Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sterilbänke	Kendro Herasafe HS 18	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
	Kendro Herasafe HS 12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
	Kendro Herasafe HS 15	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Ultraschallgerät	Sonifier B-12	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Laborschüttler	Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
	Reax 200	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
	Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific, Strasbourg Illkirch, Frankreich
	Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland

Wasserbad	WB 7 (37 °C)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Deutschland
	Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
	Rotana 46 RSC	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
	Sprout (Minizentrifuge)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 13: **Pipetten.**

Bezeichnung	Hersteller
Discovery Comfort, DV10 (0,5-10 µl)	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette, Discovery Comfort, DV8-200 (20-200 µl)	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Eppendorf Reference® (0,5-10 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® Plus (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette, Research Plus®, (30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrfachdispenser, Multipette E3	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrfachdispenser, Multipette stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetboy acu 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland

2.1.8 Computerprogramme

Tabelle 14: Computerprogramme.

Name	Hersteller
EndNote, Version X9.3.1	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FACS Diva, Version 8.0.1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FlowJo, Version 10.0.8	FlowJo LLC, Ashland, USA
Gen5	BioTek, Winooski, USA
GraphPad PRISM, Version 8	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office, Version 2009	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Zellkultur der AdCAR-NK-92-Zelllinie

Die AdCAR-NK-92-Zelllinie wurde in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem begasten Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in MEM-alpha-Komplettmedium mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Antibiotika-Antimykotikum und 100 U/ml Interleukin-2 (IL-2) kultiviert. Montags, mittwochs und freitags wurden die AdCAR-NK-92-Zellen ausgezählt und mit Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt.

2.2.1.2 Zellkultur der Neuroblastom-Zelllinien

Die Neuroblastom-Zelllinien wurden in einem CO₂ begasten Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zelllinien wurden in RPMI-1640-Komplettmedium mit 10 % FCS und 1 % Antibiotika-Antimykotikum kultiviert und bei einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Dafür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zur enzymatischen Dissoziation der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde 0,05 %ige Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben. Das Trypsin wurde mit FCS-haltigem Medium inaktiviert und die abgelösten Zellen in der entsprechenden Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt.

2.2.1.3 Bestrahlung von AdCAR-NK-92-Zellen

Für die Bestrahlung der AdCAR-NK-92-Zellen wurde das Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 elite der Firma Nordion verwendet. AdCAR-NK-92-Zellen wurden in 15 ml Polypropylen-Röhrchen mit der Energiedosis 10 Gy einer Cäsium-Quelle bestrahlt, anschließend gewaschen und mit frischem MEM-alpha-Komplettmedium mit 20 % FCS, 1 % Antibiotika-Antimykotikum und 100 U/ml IL-2 kultiviert.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der anionische Bisazofarbstoff Trypanblau dringt durch die durchlässige Membran in tote und perforierte Zellen ein und färbt deren zytosolische Proteine an, so dass sie unter dem Mikroskop blau erscheinen. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen kein Trypanblau auf und erscheinen hell. Die zu bestimmende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit 0,4 %iger Trypanblau-Lösung verdünnt. Von der verdünnten Zellsuspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in den vier Eckquadraten der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl/ml mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate (4)}} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times \text{Volumenfaktor (10}^4\text{)}$$

2.2.2 Viabilitätsassay (Trypanblau-Vitalfärbung)

Zur Bestimmung der Proliferation und Viabilität von AdCAR NK-92 Zellen wurde die Zahl der lebenden und toten Zellen einer Zellpopulation in regelmäßigen zeitlichen Abständen ermittelt.

In drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Ansatz wurden die AdCAR-NK-92-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM und 100 nM oder dem Lösungsmittel DMSO alleine als Vehikelkontrolle für 96 h kultiviert. Alle 24 h wurden die Zellpopulationen dreimal ausgezählt und wieder mit Dasatinib oder DMSO und MEM-alpha-Komplettmedium mit 100 U/ml IL-2 auf eine Zellzahl von $1 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt. Als Kontrolle der Proliferation und Viabilität unter regulären Kulturbedingungen dienten AdCAR-NK-92-Zellen, die in MEM-alpha-Komplettmedium mit 100 U/ml IL-2 kultiviert wurden.

Zur Bestimmung der Proliferation wurde die Zellzahl lebender Zellen pro ml einer Population bestimmt. Diese Zellzahl/ml wurde mit der Zellzahl/ml der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und als Prozentwert der Kontrolle angegeben:

$$\text{Proliferation [\% der Kontrolle]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen pro ml}_{\text{Testpopulation}}}{\text{Anzahl lebender Zellen pro ml}_{\text{Kontrollpopulation}}}$$

Die Viabilität einer Zellpopulation wurde bestimmt, indem die Zahl lebender Zellen einer Population ins Verhältnis zur gesamten Zellzahl dieser Population gesetzt wurde:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen pro ml}}{\text{Anzahl lebender und toter Zellen pro ml}} \times 100$$

2.2.3 Viabilitätsassay (MTS-Test)

Die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen bei Behandlung mit TGFβ, Galunisertib oder Bestrahlung wurde mit dem CellTiter 96® *AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* der Firma Promega untersucht. Das enthaltene MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium] wird intrazellulär zu Formazan reduziert. Diese Reduktionsreaktion geht mit einem Farbumschlag von gelb zu braun einher und ist abhängig von den Reduktionsmitteln NADPH bzw. NADH, die intrazellulär von mitochondrialen und extramitochondrialen Dehydrogenasen produziert werden. Nur lebende Zellen verfügen über den notwendigen Energiestoffwechsel, um MTS zu reduzieren, während apoptotische oder nekrotische Zellen dazu nicht in der Lage sind. Die Menge des entstandenen Formazans lässt sich durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm quantitativ bestimmen und verhält sich proportional zur Viabilität der Zellen in der entsprechenden Vertiefung der Mikroplatte. Die Referenzwellenlänge von 630 nm wurde zusätzlich gemessen, um die unspezifische Absorption durch Zelltrümmer oder Verschmutzung der Platte abziehen. Jede getestete Behandlung der AdCAR-NK-92-Zellen wurde in drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Platte untersucht. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit der maximalen Konzentration des Lösungsmittels der verwendeten Substanzen behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Die Hintergrund-Absorption durch spontane Interaktion von Zellkulturmedium und CellTiter 96® Reagenz wurde separat in Vertiefungen ohne Zellen kontrolliert.

Der Assay wurde in transparenten Flachboden-Platten mit 96 Vertiefungen in 100 µl MEM-alpha-Komplettmedium mit 100 U/ml IL-2 durchgeführt. Die AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor Beginn der Viabilitätsbestimmung mit 10 Gy bestrahlt oder mit TGFβ beziehungsweise Galunisertib in den entsprechenden Konzentrationen behandelt und bis zur Messung für das angegebene Zeitintervall (24 h, 48 h, 72 h oder 96 h) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 20 µl CellTiter 96® Reagenz in alle zu testenden Vertiefungen gegeben und die Mikroplatten erneut für 2 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 490 nm im Mikroplatten-Spektrophotometer gemessen.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Zellen und Partikeln auf morphologische und funktionelle Merkmale. In Suspension befindliche Zellen werden mit Überdruck durch die Probenadel ins Gerät überführt. Dort werden sie mit einer Trägerlösung in einem kontinuierlichen laminaren Hüllstrom verdünnt und fokussiert, so dass die Zellen einzeln zum Messpunkt gelangen und von mehreren hintereinander geschalteten Lasern analysiert werden. Beim Passieren des Laserstrahls werden die Zellen durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Sowohl in ungefärbtem Zustand als auch bei Bindung an Fluorochrom-markierte Antikörper streuen die Zellen dieses Licht in eine bestimmte Richtung, bzw. emittieren es in einer spezifischen Wellenlänge. Mithilfe von Filtereinheiten und Lichtdetektoren im Instrument werden diese Streulicht- und Fluoreszenzlichtsignale weitergeleitet und gemessen.

Bei der Messung des Streulichtsignals wird eine Veränderung der Lichtrichtung analysiert. Im *Forward scatter* (FSC) Kanal wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel und im *Side scatter* (SSC) Kanal die Reflexion des Lichts im rechten Winkel registriert. Mithilfe des FSC wird die Zellgröße und mithilfe des SSC die Zellgranularität gemessen.

Das Fluoreszenzlichtsignal wird von Sensoren, die spezifisch für bestimmte Wellenlängenbereiche sind, detektiert. Fluoreszenzlicht entsteht, wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Fluorochrom trifft. Durch die Absorption

von Photonen werden die Elektronen des Fluorochroms in ein energetisch höheres Orbital gehoben und emittieren beim Zurückfallen auf ihr energetisches Ausgangsniveau Photonen. Der Wellenlängenbereich, in dem Fluorochrome durch Lichtenergie angeregt werden können, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet und der Wellenlängenbereich, in dem sie Fluoreszenzlicht emittieren nennt sich Emissionsspektrum. Die Aufteilung der freiwerdenden Energie in Wärme und Licht bedingt, dass das emittierte Fluoreszenzlicht langwelliger als das Anregungslicht ist. Die Intensität des gemessenen Fluoreszenzlichts ist direkt proportional zur Anzahl von Bindungsstellen, die mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper besetzt sind und ermöglicht Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die Anzahl von intrazellulär oder auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörpern. Diese Antikörper sind als Primärantikörper entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiert oder sie sind biotinyliert und werden dann mittels eines Fluorochrom-markierten, anti-Biotin-Sekundärantikörper detektiert.

Nach der Detektion werden die eintreffenden Lichtsignale im Gerät als elektrische Signale weiterverarbeitet und einem Messkanal zugewiesen. Ihre Amplitude wird dabei in elektrische Spannung übersetzt. Die Verstärkung der Signale kann linear oder logarithmisch erfolgen. Konventionell werden die Streulichtsignale des FSC und SSC linear und die Fluoreszenzlichtsignale logarithmisch verstärkt.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden 3×10^5 Zellen pro Röhrchen bei 4°C gefärbt. Dafür wurden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer bestehend aus Dulbeccos Phosphat gepufferter Salzlösung (DPBS) mit 2 % FCS und 0,4 % EDTA gewaschen und 5 min bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 50 μl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 15 min unter Lichtausschluss bei 4°C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Danach wurden sie mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Bei Verwendung biotinylierter Primärantikörper wurden die Zellen anschließend mit einem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gefärbt. Für die entsprechenden Analysen wurden jeweils 5×10^4 Zellen im Durchflusszytometer (FACSCanto II) gemessen und mittels FlowJo Software

ausgewertet. Als Kontrollen der Geräteeinstellungen wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Bei Einsatz von Fluorochrom-markierten Antikörpern dienten Isotyp-Antikörper als Kontrolle für unspezifische Bindungen. Bei Verwendung von Biotin-markierten Antikörpern in Kombination mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper, wurde der Sekundärantikörper alleine als Kontrolle für unspezifische Bindungen verwendet.

2.2.5 Zytotoxizitätsassay (Calcein-Release-Test)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber Neuroblastom-Zelllinien wurden Calcein-Release-Tests durchgeführt. Die Funktionsweise dieses Tests basiert auf der Messung der Fluoreszenz von Calcein aus dem Zellüberstand der Zielzellen. Dafür werden die Zielzellen zunächst mit Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM), einem nicht fluoreszierenden Molekül, inkubiert, das aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften die Zellmembran leicht passieren kann. Im Inneren der Zelle wird Calcein-AM von Esterasen enzymatisch zu Calcein umgewandelt. Dabei werden die Acetatreste und die Acetoxymethylester-Gruppe hydrolysiert, so dass das Molekül hydrophil wird und aufgrund seiner Carboxygruppe die Zelle nicht mehr verlassen kann. Intrazellulär komplexiert Calcein Calciumionen und fluoresziert grün. Die markierten Zielzellen werden zusammen mit den zytotoxischen Effektorzellen inkubiert. Bei der Lyse der Zielzellen wird das fluoreszierende Calcein freigesetzt und kann mit einem Anregungsmaximum bei der Wellenlänge 485 nm und einem Emissionsmaximum bei 520 nm im Überstand gemessen werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge des freigesetzten Calceins und zur Anzahl der lysierten Zielzellen.

Um die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu berechnen, wird das Ergebnis im Hinblick auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen betrachtet. Für diese Berechnung müssen die Werte der Maximallyse, der Spontanlyse und der Hintergrundwert bestimmt werden. Als Maximallyse wird der Wert bezeichnet, der bei Lyse aller Zielzellen erreicht wird. Zur Bestimmung dieses Werts wurde ein Teil der Zielzellen mit Ultraschall aufgeschlossen oder mit 0,1 %iger Tritonlösung behandelt. Der Begriff Spontanlyse beschreibt den Wert, der

zustande kommt, wenn ein Teil der Zielzellen während des Versuchs ohne Einwirkung der Effektorzellen abstirbt und dabei Calcein freisetzt. Die Spontanlyse wurde bestimmt, indem mit Calcein markierte Zielzellen ohne Antikörper oder Effektorzellen eingesetzt wurden. Der Hintergrundwert ergibt sich durch eine Grundaktivität, die immer im Medium vorhanden ist. Für die Kontrolle des Hintergrundwerts wurde 1 ml von der Zielzellsuspension abgenommen und für 5 min bei 200 g und 37°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl in die entsprechende Vertiefung der Mikroplatte pipettiert.

Die spezifische Lyse der Zielzellen in Prozent wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{spezifische Lyse} - \text{Spontanlyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})} \times 100$$

Der Calcein-Release-Test wurde bei 37 °C in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen und konisch zulaufendem Boden (V-Boden) mit RPMI-1640-Calcein-Release-Medium (CR-Medium) mit GlutaMAX, 2 % FCS und 1 % Antibiotika-Antimykotikum durchgeführt. Pro Assay wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit Triplikaten pro Vertiefung der verwendeten Mikroplatte angesetzt.

Die Konzentration der bAK wurde mit CR-Medium auf 100 ng/ml eingestellt. Jeweils 50 µl der Antikörper Lösung wurden in die entsprechenden Vertiefungen der Mikroplatte vorgelegt, um eine finale Antikörperkonzentration von 25 ng/ml pro Vertiefung zu erreichen. Die bAK dienen als Adapter zwischen Zielzelle und AdCAR-NK-92-Zelle und vermitteln die Lyse der Zielzellen. Sie wurden gegen Antigene ausgewählt, deren Expression auf den Zielzelllinien durchflusszytometrisch bestätigt wurde und binden spezifisch an diese Zielstrukturen. Die gebundenen bAK werden von den AdCAR-NK-92-Zellen erkannt, deren CAR spezifisch an ein Biotin-Neoepitop am Fc-Fragment der bAK bindet und aktiviert wird. Durch Aktivierung der zytotoxischen Kaskade der AdCAR-NK-92-Zelle wird die Lyse der Zielzelle induziert. Als Kontrolle der Lyse, die von bAK ohne Effektorzellen induziert wurde, dienten mit Calcein markierte Zielzellen, die nur mit den jeweils eingesetzten bAK inkubiert wurden. Um Abweichungen infolge unterschiedlicher Epitope zu vermeiden, wurden für die

durchflusszytometrischen Analysen und für die Calcein-Release-Tests die gleichen bAK als Adaptermoleküle eingesetzt.

Die Neuroblastom-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 in 1 ml RPMI 1640 Komplettmedium eingestellt und für 30 min im Brutschrank mit $10 \mu\text{M}$ Calcein-AM gefärbt. Nach der Färbung wurden die Neuroblastom-Zellen zweimal mit 10 ml gewärmtem CR-Medium gewaschen und 5 min bei 200 g und 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 5 ml gewärmtem CR-Medium resuspendiert. Die Neuroblastom-Zellen wurden auf 5×10^4 pro ml eingestellt. In jede Vertiefung der Mikroplatte wurden $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurden die mit bAK und Zielzellen vorbereiteten Mikroplatten für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die AdCAR-NK-92-Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen pro ml in CR-Medium eingestellt. Mit einer Verdünnungsreihe wurden Effektor- zu Zielzellverhältnisse von 10:1; 5:1 und 2,5:1 erstellt und $50 \mu\text{l}$ der Effektorzellsuspension in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Die Platten mit einem Endvolumen von $200 \mu\text{l}$ pro Vertiefung wurden 5 min bei 200 g und 37°C zentrifugiert und für 2 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten erneut 5 min bei 200 g und 37°C zentrifugiert. Aus jeder Vertiefung wurden $100 \mu\text{l}$ Überstand in eine schwarze $\mu\text{Clear}^\circledast$ Mikroplatte mit 96 Vertiefungen und Flachboden überführt, um eine mögliche Fluoreszenzinterferenz zwischen den einzelnen Vertiefungen zu verhindern. Die Durchführung der Messung erfolgte mit einem Multimode-Mikroplatten-basierten Spektrophotometer.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Die statistische Analyse von zwei experimentellen Gruppen zu mehreren Zeitpunkten erfolgte mit multiplen t-Tests und der Holm-Sidak-Methode zur Korrektur multipler Mittelwertsvergleiche. Zum Vergleich mehrerer experimenteller Gruppen zu mehreren Zeitpunkten bzw. mit unterschiedlichen Effektor- zu Zielzellverhältnissen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Tests nach Dunnet bzw. Tukey durchgeführt.

Mithilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten wurde der monotone Zusammenhang von zwei Variablen untersucht. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert (ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Evaluierung potenzieller Zielantigene für die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie des Neuroblastoms

3.1.1 FACS-basierte Charakterisierung der Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien

Um neben den bereits bekannten Neuroblastom-Antigenen weitere Oberflächenantigene für die Funktionstestung der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie zu identifizieren, wurde die Expression von CD146 (MCAM), CD171 (L1CAM), CD221 (IGF-1R), CD246 (ALK) und CD271 (LNGFR) auf den Neuroblastom-Zelllinien IMR-32, Kelly, LAN-1, LS, SH-SY5Y, SK-N-AS und SK-N-BE mittels FACS-Analyse untersucht. Der Anteil Antigen-exprimierender Zellen (PPZ) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), ein Maß für die Antigendichte auf der Zelloberfläche, sind in Tabelle 1 farbcodiert angegeben.

Abhängig von der jeweiligen Neuroblastom-Zelllinie wurde eine unterschiedliche Expression der Antigene festgestellt. Das Antigen CD146 war auf allen Zelllinien hoch exprimiert und wurde auf mehr als 90,0 % der Zellen von Kelly, LAN-1, LS, SH-SY5Y und SK-N-AS mit MFI-Werten zwischen 52,57 und 22,54 nachgewiesen. Die höchste Antigendichte von CD146 wurde mit 88,5 % positiven Zellen und einem MFI Wert von 75,22 bei der Zelllinie IMR-32 festgestellt. Das Antigen CD171 wurde, abgesehen von der Zelllinie LS, auf allen Zelllinien überexprimiert. Dabei wurden mehr als 90,0 % der Zellen von IMR-32, Kelly, LAN-1 und SH-SY5Y positiv auf CD171 getestet. Der höchste MFI-Wert von 117,94 wurde ebenfalls bei der Zelllinie IMR-32 nachgewiesen. Die Antigene CD221 und CD271 wurden beide von einzelnen Zelllinien hoch exprimiert. Während CD221 auf mehr als 95,0 % der Zellen von Kelly, LAN-1 und SH-SY5Y nachweisbar war, wurden jeweils 99,8 % der Zellen von LAN-1 und LS und 97,9 % der Zellen von SH-SY5Y positiv auf CD271 untersucht. Mit MFI-Werten von 116,89 bei LS und 109,01 bei LAN-1 wurde CD271 auf diesen beiden Zelllinien deutlich überexprimiert. Die geringste Expression aller untersuchten Antigene wurde Zelllinien-übergreifend bei CD246 festgestellt.

Aufgrund hoher Expression auf allen untersuchten Zelllinien bieten sich CD146 und CD171 besonders als Zielstrukturen für die Immuntherapie an, während

CD221 und CD271 selektiv exprimiert wurden und sich daher eingeschränkt als Zielstrukturen eignen. Dementsprechend wurde die funktionelle Testung der AdCAR-NK-92 Zellen in Zytotoxizitäts-Assays mit den Zelllinien Kelly, LAN-1, LS, SH-SY5Y und SK-N-AS mit bAK gegen die Antigene CD146, CD171, CD221, und CD271 durchgeführt, da CD246 auf keiner der untersuchten Zelllinien relevant exprimiert wurde.

Tabelle 15: **Durchflusszytometrische Analyse der Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien.**

Dargestellt ist die Expression der Antigene CD146, CD171, CD221, CD246 und CD271 in Form von Prozent positiven Zellen (PPZ) und der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bei den Zelllinien IMR-32, Kelly, LAN-1, LS, SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-BE. Die Farbcodierung stellt eine Zunahme der Messwerte von Rot über Gelb nach Grün dar (siehe Legende).

		Zelllinie						
Antigen	Antigen-expression	IMR-32	Kelly	LAN-1	LS	SH-SY5Y	SK-N-AS	SK-N-BE
CD146	PPZ	88,5%	99,6%	99,9%	95,0%	99,8%	97,8%	62,3%
	MFI	75,22	22,54	47,66	23,31	35,44	52,57	14,81
CD171	PPZ	98,5%	99,7%	99,7%	30,8%	94,4%	73,6%	74,9%
	MFI	117,94	94,54	43,95	1,88	15,82	10,29	31,35
CD221	PPZ	22,2%	97,3%	96,7%	35,7%	99,5%	7,3%	3,1%
	MFI	3,97	8,44	6,81	2,39	12,78	1,30	1,21
CD246	PPZ	5,6%	1,4%	1,7%	1,7%	0,4%	1,2%	0,7%
	MFI	1,30	1,00	1,09	1,02	0,96	0,99	0,90
CD271	PPZ	21,6%	76,6%	99,8%	99,8%	97,9%	7,7%	5,7%
	MFI	2,84	6,77	109,01	116,89	15,81	1,12	1,09

Legende	sehr niedrig	niedrig	moderat	hoch	sehr hoch
----------------	--------------	---------	---------	------	-----------

3.1.2 Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen

Um die Funktionalität und das zytotoxische Potenzial der AdCAR-NK-92-Zellen zu untersuchen, wurden Calcein-Release-Tests mit verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien als Zielzellen durchgeführt. Als Adapter wurden bAK gegen Antigene, deren Expression zuvor durchflusszytometrisch ermittelt wurde, ausgewählt, um den Einfluss der Antigenexpression auf die AdCAR-vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen. Zur Testung der AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit verschiedenen bAK bei unterschiedlichen Neuroblastom-

Zelllinien wurden die drei Effektor- zu Ziellzellverhältnisse (E:Z-Verhältnisse) 2,5:1, 5:1 und 10:1 ausgetestet. Mit Verringerung der E:Z-Ratio zeigte sich auch eine Abnahme der AdCAR-NK-92-spezifischen Zellyse.

In Kombination mit bAK gegen CD146 zeigten AdCAR-NK-92-Zellen gegen alle getesteten Zelllinien die höchste Zytotoxizität. Bei der Zelllinie LS wurde mit bAK gegen CD146 (64,97 % \pm 3,07 %) und CD271 (64,23 % \pm 4,08 %) die insgesamt höchste AdCAR-vermittelte spezifische Zellyse erzielt. An zweiter Stelle stand die Zelllinie LAN-1, bei der mit bAK gegen CD146 eine AdCAR-vermittelte, spezifische Zellyse von 61,47 % \pm 7,30 % festgestellt wurde. Gegenüber den Zelllinien Kelly und SK-N-AS wurde mit bAK gegen CD146 jeweils eine AdCAR-vermittelte Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen von knapp über 50 % festgestellt. Das Antigen CD171 war auf den Zelllinien Kelly und SK-N-AS exprimiert, allerdings ging die höhere Antigendichte auf Kelly-Zellen verglichen mit SK-N-AS-Zellen (MFI-Wert von 94,54 versus 10,29) auch mit einer höheren spezifischen AdCAR-vermittelten Zellyse der Kelly-Zellen einher (47,26 % \pm 5,18 % bei Kelly versus 21,61 % \pm 7,30 % bei SK-N-AS). Gegenüber den anderen Zelllinien erwies sich SH-SY5Y trotz vergleichbarer Antigenexpression als wenig empfänglich für die AdCAR-vermittelte Zytotoxizität. Ein signifikanter Unterschied der spezifischen Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen mit bAK gegenüber der intrinsischen (nicht CAR-vermittelten) Zytotoxizität ohne bAK gegen SH-SY5Y-Zellen wurde dennoch festgestellt. Bemerkenswert war, dass AdCAR-NK-92-Zellen lediglich gegen die Zelllinie LS eine relevante intrinsische Zytotoxizität (30,52 % \pm 6,22 %) aufwiesen. Dennoch war die spezifische Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit bAK auch gegenüber der Zelllinie LS signifikant höher.

Gemäß der Funktionsweise des Adapter-CAR-Systems war in diesen Experimenten die spezifische AdCAR-vermittelte Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber Zielzellen immer dann signifikant höher als die intrinsische Zytotoxizität, wenn bAK gegen Antigene eingesetzt wurden, die relevant auf den Zielzelllinien exprimiert wurden.

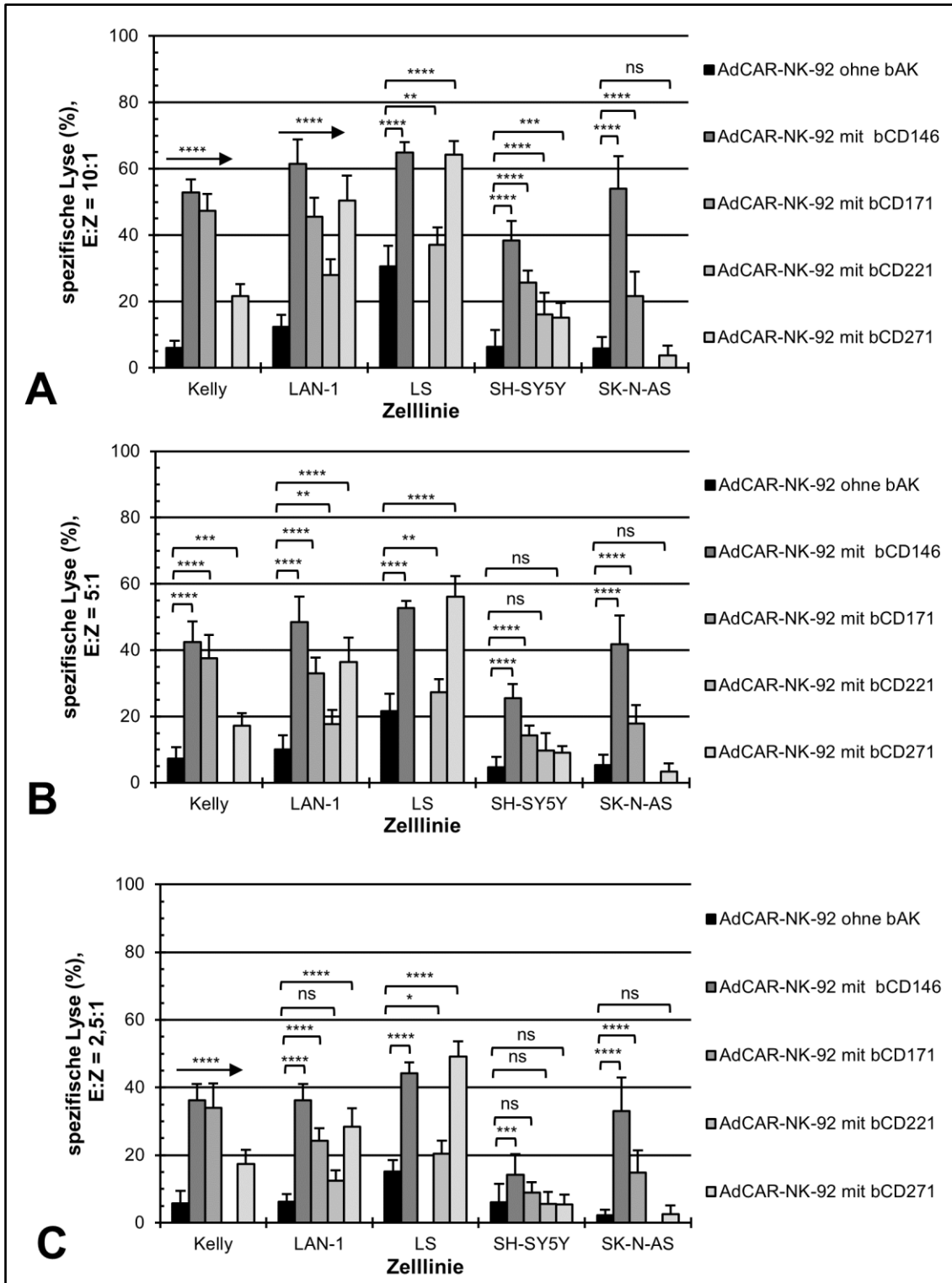


Abbildung 4: **Calcein-Release-Tests mit Adapter-CAR-NK-92-Zellen.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen verschiedene mit Calcein-AM markierte Neuroblastom-Zelllinien nach 2h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 (**A**), 5:1 (**B**) und 2,5:1 (**C**; Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3; **** p ≤ 0,0001, *** p ≤ 0,001, ** p ≤ 0,01, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Dunnett post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.1.3 Korrelation zwischen AdCAR-NK-92-vermittelter spezifischer Lyse und Antigenexpression

Die Beobachtung, dass die AdCAR-NK-92-vermittelte spezifische Zytotoxizität in Kombination mit bAK positiv mit der Antigendichte auf der entsprechenden Zielzelllinie korreliert, wurde durch Bestimmung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten überprüft.

Graphisch wurden die Antigen-Zelllinien-Paare als Punkte in einem Koordinatensystem in Abbildung 5 dargestellt. Die Mittelwerte der AdCAR-NK-92-vermittelten spezifischen Zellyse mit bAK im E:Z-Verhältnis von 10:1 wurden auf der y-Achse und die zugehörigen MFI-Werte der Antigenexpression der jeweiligen Neuroblastom-Zelllinie auf der x-Achse aufgetragen. Mit einem p-Wert von 0,0006 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,76 korreliert die AdCAR-NK-92-vermittelte spezifische Lyse in Kombination mit bAK positiv und signifikant mit der zugehörigen Antigendichte auf der jeweiligen Zielzelllinie.

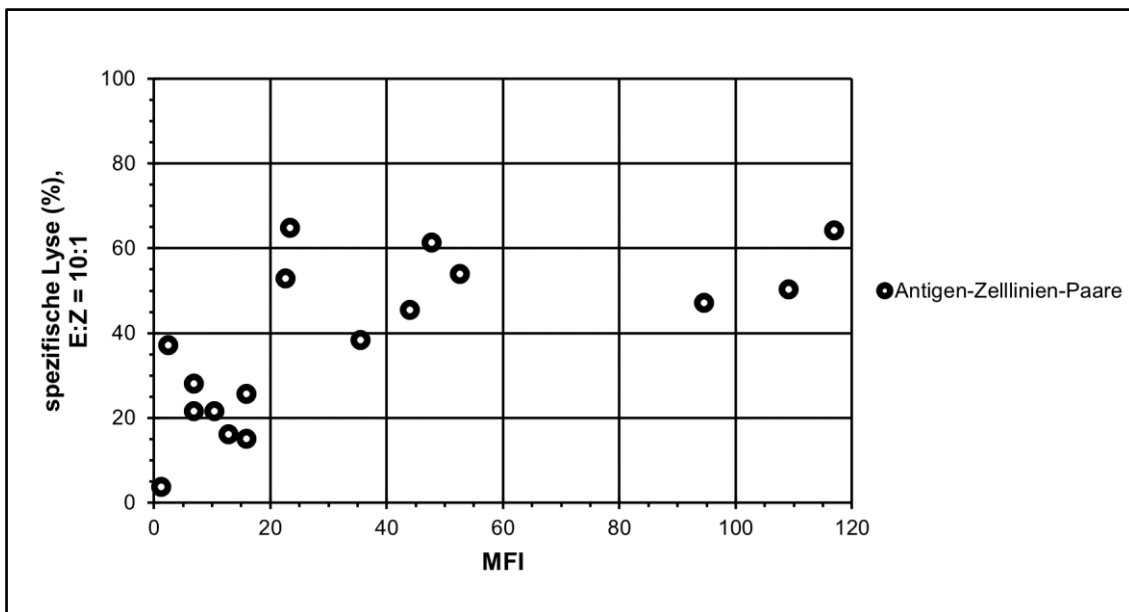


Abbildung 5: **Korrelation zwischen AdCAR-NK-92-vermittelter spezifischer Lyse und MFI-Wert.**

Antigen-Zelllinien-Paare sind jeweils als Kreis dargestellt. Auf der y-Achse wurden die Mittelwerte der AdCAR-NK-92-vermittelten spezifischen Lyse mit bAK im E:Z-Verhältnis von 10:1 in Prozent angegeben. Auf der x-Achse wurden die MFI-Werte der zugehörigen Antigenexpression auf den jeweiligen Neuroblastom-Zelllinien angegeben. Der Spearman'sche Korrelationskoeffizient betrug 0,76 bei einem p-Wert von 0,0006.

3.2 Untersuchung der Auswirkungen von TGF β auf AdCAR-NK-92-Zellen

3.2.1 Bestimmung der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β oder dem TGF β Rezeptor-1-Inhibitor Galunisertib

Im Hinblick auf die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie wurde untersucht, ob das Zytokin *Transforming growth factor β -1* (TGF β) sich inhibierend auf die Viabilität, das Rezeptorprofil oder die Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen auswirkt und ob diese Effekte, falls vorhanden, mit dem TGF β -Rezeptor-1-Inhibitor Galunisertib aufgehoben werden können.

Zunächst wurde der Einfluss von TGF β und Galunisertib auf die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen mithilfe von MTS-Tests untersucht. AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit TGF β in den Konzentrationen 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml oder mit Galunisertib in den Konzentrationen 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität nach 24 h, 48 h und 96 h bestimmt.

Unabhängig vom Beobachtungszeitraum und der eingesetzten TGF β -Konzentration konnte kein signifikanter Unterschied der Viabilität der mit TGF β inkubierten AdCAR-NK-92-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen festgestellt werden. Auch bei Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit Galunisertib in den Konzentrationen 1 μ M, 2,5 μ M und 10 μ M wurde unabhängig vom Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle entdeckt. Lediglich bei Inkubation mit Galunisertib in der Konzentration 5 μ M konnte zum Messzeitpunkt 96 h eine geringe, aber signifikante Erhöhung des Viabilitätswerts um 14,57 Prozentpunkte verglichen mit der Kontrolle beobachtet werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass weder die Inkubation mit TGF β noch die Inkubation mit Galunisertib zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen führt.

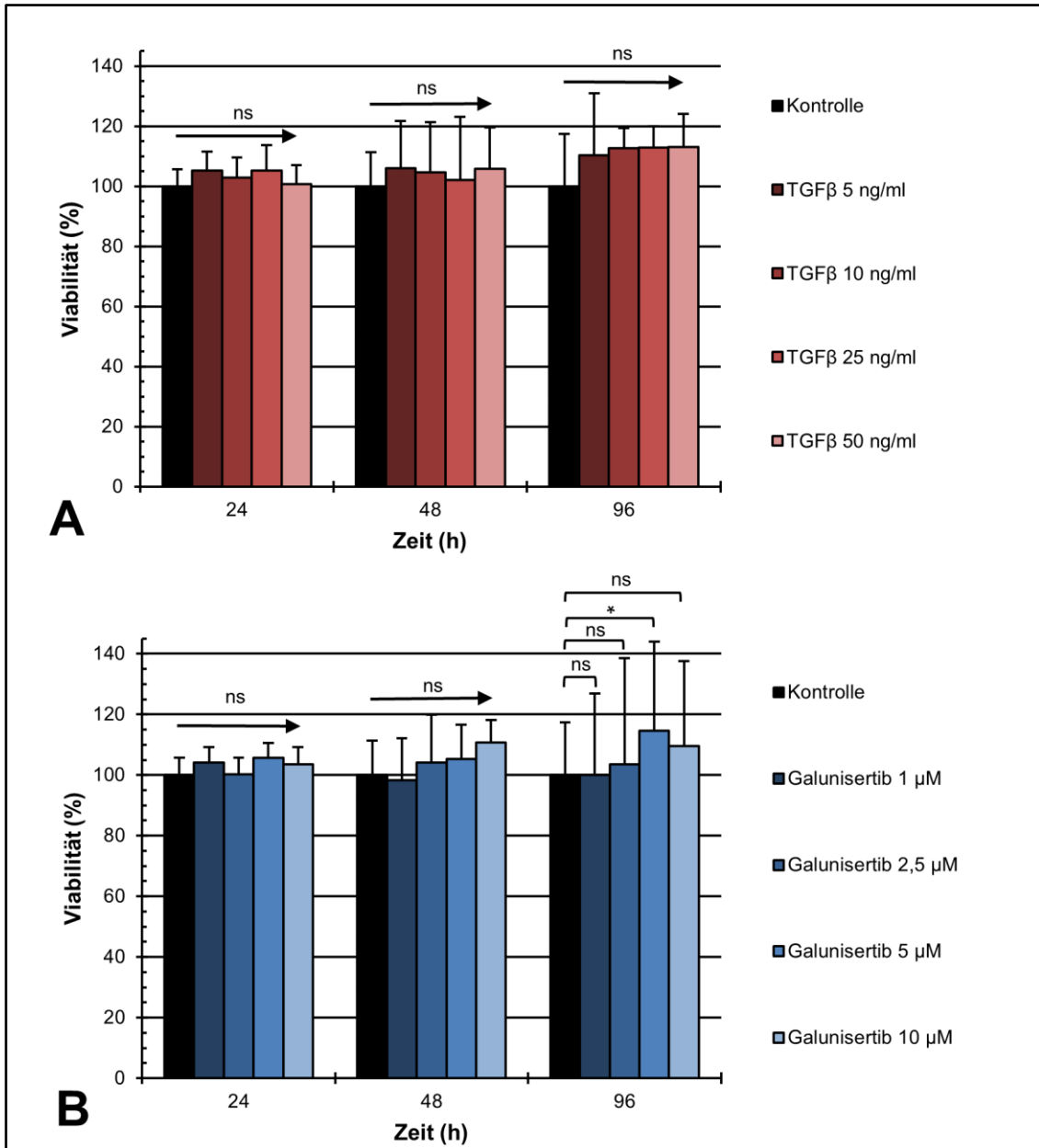


Abbildung 6: **Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGFβ oder Galunisertib.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden (A) mit TGFβ (5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml) oder (B) Galunisertib (1 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM) bis zum angegebenen Zeitpunkt (24 h, 48 h, 96 h) inkubiert. DMSO wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. Die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde durch Ermittlung der Absorption nach 2 h Inkubation mit Celltiter 96® Reagenz bestimmt und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in Prozent angegeben (Mittelwerte ± SDvM, n = 3, * p ≤ 0,01, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Dunnet post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.2.2 FACS-basierte Charakterisierung des Rezeptorprofils der Adapter-CAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β

Um den Einfluss von TGF β auf das NK-Zell-Rezeptorprofil von AdCAR-NK-92-Zellen zu untersuchen, wurden diese für 96 h mit TGF β in den Konzentrationen 10 ng/ml oder 50 ng/ml inkubiert. Anschließend wurde die Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren CD226 (DNAM-1), CD314 (NKG2D), NKp80, CD335 (NKp46), CD336 (NKp44) und CD337 (NKp30) und der inhibitorischen Rezeptoren CD85j (ILT-2), CD159a (NKG2A), CD161 (NKR-P1A), CD158a (KIR2DL1), CD158b1/2 (KIR2DL2/3) und CD158e/k (KIR3DL1/2) untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der Rezeptoren CD94 (KLRD1) und CD244 (2B4), deren Wirkung aktivierend oder inhibitorisch sein kann, und die Expression der Oberflächenantigene CD25 (IL2R α), CD62L (L-Selectin) und CD69 ermittelt. Die Oberflächenexpression von CD34 wurde stellvertretend für die Expression des AdCAR bestimmt, weil CD34 als Markergen dient, dessen Expression an die des Zielgens gekoppelt ist. Der Anteil positiver Zellen (PPZ) und die MFI sind in Tabelle 2 farbcodiert dargestellt.

In Bezug auf die aktivierenden Rezeptoren ergab die Untersuchung, dass CD226, CD314, CD336 und CD337 von mehr als 95,0 % der AdCAR-NK-92-Zellen exprimiert wurden, während die Expression von CD335 mit 82,6 % positiven Zellen geringer war. Eine Expression von NKp80 auf AdCAR-NK-92-Zellen war nicht nachweisbar. Nach Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β konnte eine deutlich verminderte Expression der Rezeptoren CD226, CD314 und CD337 und eine leicht verminderte Expression des Rezeptors CD335 festgestellt werden, während die Expression von CD336 unverändert blieb. Auffällig waren vor allem die deutliche Abnahme des Anteils von AdCAR-NK-92-Zellen, die positiv auf CD226 untersucht wurden, und die reduzierte Antigendichte von CD314. Während der Anteil an CD226-positiven Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen bei 97,8 % lag, wurde nach Inkubation mit TGF β nur noch ein Anteil positiver Zellen von 41,1 % (10 ng/ml TGF β) bzw. von 39,9 % (50 ng/ml TGF β) beobachtet. Bei CD314 war nach Inkubation mit TGF β vor allem die Antigendichte deutlich reduziert: Mit 26,93 war der MFI-Wert der Kontroll-

AdCAR-NK-92-Zellen wesentlich höher als die Werte nach Inkubation mit 10 ng/ml TGF β (5,73) und 50 ng/ml TGF β (5,27).

Im Hinblick auf die inhibitorischen Rezeptoren ergab die Untersuchung, dass CD85j und CD159a zu jeweils 100,0 % auf AdCAR-NK-92-Zellen exprimiert wurden. Eine relevante Expression der KIRs CD158a, CD158b1/2 und CD158e/k oder des Rezeptors CD161 auf AdCAR-NK-92-Zellen wurde nicht beobachtet. Nach Inkubation mit TGF β konnte keine Veränderung des Anteils CD85j- oder CD159a-exprimierender Zellen festgestellt werden, aber in beiden Fällen eine verminderte Antigendichte: Bei CD85j lag der MFI-Wert von Kontrollzellen bei 58,99 und damit über den MFI-Werten nach Inkubation mit TGF β von 38,47 (10 ng/ml) und 42,12 (50 ng/ml). Auch bei CD159a konnte verglichen mit dem MFI-Wert der Kontrolle von 66,28 eine deutliche Reduzierung der MFI-Werte auf 50,66 (10 ng/ml) bzw. 52,71 (50 ng/ml) nach Inkubation mit TGF β festgestellt werden.

Die Rezeptoren CD94 und CD244 wurden beide auf AdCAR-NK-92-Zellen exprimiert. Während der Anteil CD94-positiver Zellen unabhängig von TGF β 100,0 % betrug, konnte nach Inkubation mit TGF β eine Abnahme der Antigendichte mit MFI-Werten von 21,45 (10 ng/ml) und 20,88 (50 ng/ml) gegenüber dem MFI-Wert der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen von 31,84 beobachtet werden. Bei CD244 wurde nach Inkubation mit TGF β sowohl eine geringe Abnahme des Anteils positiver Zellen als auch eine leichte Reduktion der Antigendichte festgestellt.

Die Oberflächenantigene CD25 und CD69 wurden ebenfalls auf AdCAR-NK-92-Zellen exprimiert, während keine relevante Expression von CD62L festgestellt werden konnte. Im Fall von CD25 führte die Inkubation mit TGF β zu einer deutlichen Abnahme der Expression: Neben der Reduktion des Anteils positiver Zellen von 83,7 % (Kontrolle) auf 31,8 % (10 ng/ml) bzw. 36,1 % (50 ng/ml) war die Antigendichte von CD25 ebenfalls herabgesetzt. Demgegenüber blieb die Expression von CD69 auf 100,0 % der AdCAR-NK-92-Zellen auch nach Inkubation mit TGF β unverändert.

Bemerkenswert ist, dass CD34, dessen Expression stellvertretend für die des AdCAR bestimmt wurde, unbeeindruckt von einer Inkubation mit TGF β auf über

97,0 % der AdCAR-NK-92-Zellen in hoher Antigendichte mit MFI-Werten von über 200 exprimiert wurde.

Insgesamt konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, dass die Expression verschiedener aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren nach Inkubation mit TGF β vermindert war, während die Expression des CARs nicht beeinflusst wurde.

Tabelle 16: **Durchflusszytometrische Analyse von NK-Zell-Rezeptoren und Oberflächenantigenen auf AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGFβ.**

Dargestellt ist das Antigenprofil (Prozent positive Zellen (PPZ) und MFI) von AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit TGFβ in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml. Die Farbcodierung stellt eine Zunahme der Messwerte von Rot über Gelb nach Grün dar (siehe Legende).

Antigen	Funktion	Antigen-expression	AdCAR-NK-92 Kontrolle	AdCAR-NK-92 TGFβ (10 ng/ml, 96 h)	AdCAR-NK-92 TGFβ (50 ng/ml, 96 h)
CD226	aktivierend	PPZ	97,8%	41,1%	39,9%
		MFI	5,57	2,04	2,07
CD314	aktivierend	PPZ	99,7%	67,0%	69,1%
		MFI	26,93	5,73	5,27
CD335	aktivierend	PPZ	82,6%	77,6%	67,7%
		MFI	3,85	3,10	2,82
CD336	aktivierend	PPZ	96,8%	96,5%	95,6%
		MFI	7,07	7,18	6,02
CD337	aktivierend	PPZ	96,6%	65,5%	59,8%
		MFI	12,09	5,51	4,52
NKp80	aktivierend	PPZ	0,8%	0,3%	0,4%
		MFI	0,89	0,83	0,83
CD85j	inhibitorisch	PPZ	100,0%	100,0%	100,0%
		MFI	58,99	38,47	42,12
CD158a	inhibitorisch	PPZ	1,6%	1,2%	1,2%
		MFI	1,00	0,99	0,98
CD158b	inhibitorisch	PPZ	7,4%	5,1%	7,4%
		MFI	1,65	1,95	1,91
CD158e/k	inhibitorisch	PPZ	1,3%	6,1%	5,8%
		MFI	1,27	1,35	1,37
CD159a	inhibitorisch	PPZ	100,0%	100,0%	100,0%
		MFI	66,28	50,66	52,71
CD161	inhibitorisch	PPZ	0,3%	0,6%	0,3%
		MFI	1,05	0,93	0,91
CD94	aktivierend/ inhibitorisch	PPZ	100,0%	100,0%	100,0%
		MFI	31,84	21,45	20,88
CD244	aktivierend/ inhibitorisch	PPZ	99,6%	94,8%	89,8%
		MFI	5,62	4,02	3,48
CD25	Proliferations-Marker	PPZ	83,7%	31,8%	36,1%
		MFI	3,48	1,86	2,00
CD62L	Polyfunktionalitäts-Marker	PPZ	0,8%	0,2%	0,2%
		MFI	0,80	0,79	0,77
CD69	Zytotoxizitäts-Marker	PPZ	100,0%	100,0%	100,0%
		MFI	37,06	44,81	38,99
CD34	AdCAR-Markergen	PPZ	98,2%	97,6%	98,0%
		MFI	206,65	347,25	381,21

Legende	sehr niedrig	niedrig	moderat	hoch	sehr hoch
---------	--------------	---------	---------	------	-----------

3.2.3 Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β

Die Auswirkung von TGF β auf die Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde mit Calcein-Release-Tests untersucht, um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß TGF β die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen beeinflussen kann. Als Zielzellen wurden die Neuroblastom-Zelllinien Kelly und LAN-1 mit bAK gegen die Antigene CD200, CD276 und EGFR eingesetzt. Vor Durchführung der Tests wurden die AdCAR-NK-92-Zellen für 48 h oder für 96 h mit TGF β in der Konzentration 10 ng/ml inkubiert. AdCAR-NK-92-Zellen, die nicht mit TGF β inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Da sich mit Verringerung des Effektor- zu Zielzellverhältnisses auch eine Abnahme der Zytotoxizitätswerte zeigte, werden hier stellvertretend die Zytotoxizitätswerte des E:Z-Verhältnisses von 10:1 näher vorgestellt.

Bei der Zielzelllinie Kelly wurde mit allen verwendeten bAK ein statistisch signifikanter Unterschied der spezifischen Zytotoxizität zwischen AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit TGF β und Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen festgestellt. Die größte Zytotoxizitätsabnahme wurde bei Verwendung eines bAK gegen CD276 beobachtet: Gegenüber dem Kontrollwert (60,40 % \pm 4,01 %) war der Zytotoxizitätswert von AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit TGF β (41,98 % \pm 7,73 %) deutlich reduziert. Auch bei 96-stündiger Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β konnten bei Verwendung von bAK gegen CD200 und CD276 statistisch signifikant verringerte spezifische Zytotoxizitätswerte gegenüber Kelly-Zellen festgestellt werden.

Gegenüber der Zelllinie LAN-1 wurde bei Verwendung von bAK gegen CD200 und CD276 eine signifikant verringerte, spezifische Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit TGF β festgestellt. Der größte Unterschied der spezifischen Zytotoxizität wurde erneut mit einem bAK gegen CD276 beobachtet: Hier lag der spezifische Zytotoxizitätswert der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β bei 58,87 % \pm 5,15 % und damit unter dem Wert der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen (70,36 % \pm 7,74 %). Bei 96-stündiger Inkubation mit TGF β war die AdCAR-induzierte, spezifische Zytotoxizität

gegenüber der Zelllinie LAN-1 nur mit bAK gegen CD200 signifikant geringer als die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Kontrollzellen.

Die beobachtete Abnahme der intrinsischen Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β gegenüber den Zelllinien Kelly oder LAN-1 erwies sich als nicht statistisch signifikant.

Insgesamt wurde in diesem Experiment eine Abnahme der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β in der Konzentration 10 ng/ml beobachtet. Allerdings waren diese Abnahmen je nach Zielzelllinie und eingesetztem bAK unterschiedlich stark ausgeprägt und verglichen mit den jeweiligen Kontrollwerten nur in acht von 16 Experimenten statistisch signifikant. Ein Zusammenhang der Inkubationszeit mit TGF β und der Zytotoxizitätsabnahme konnte nicht beobachtet werden.

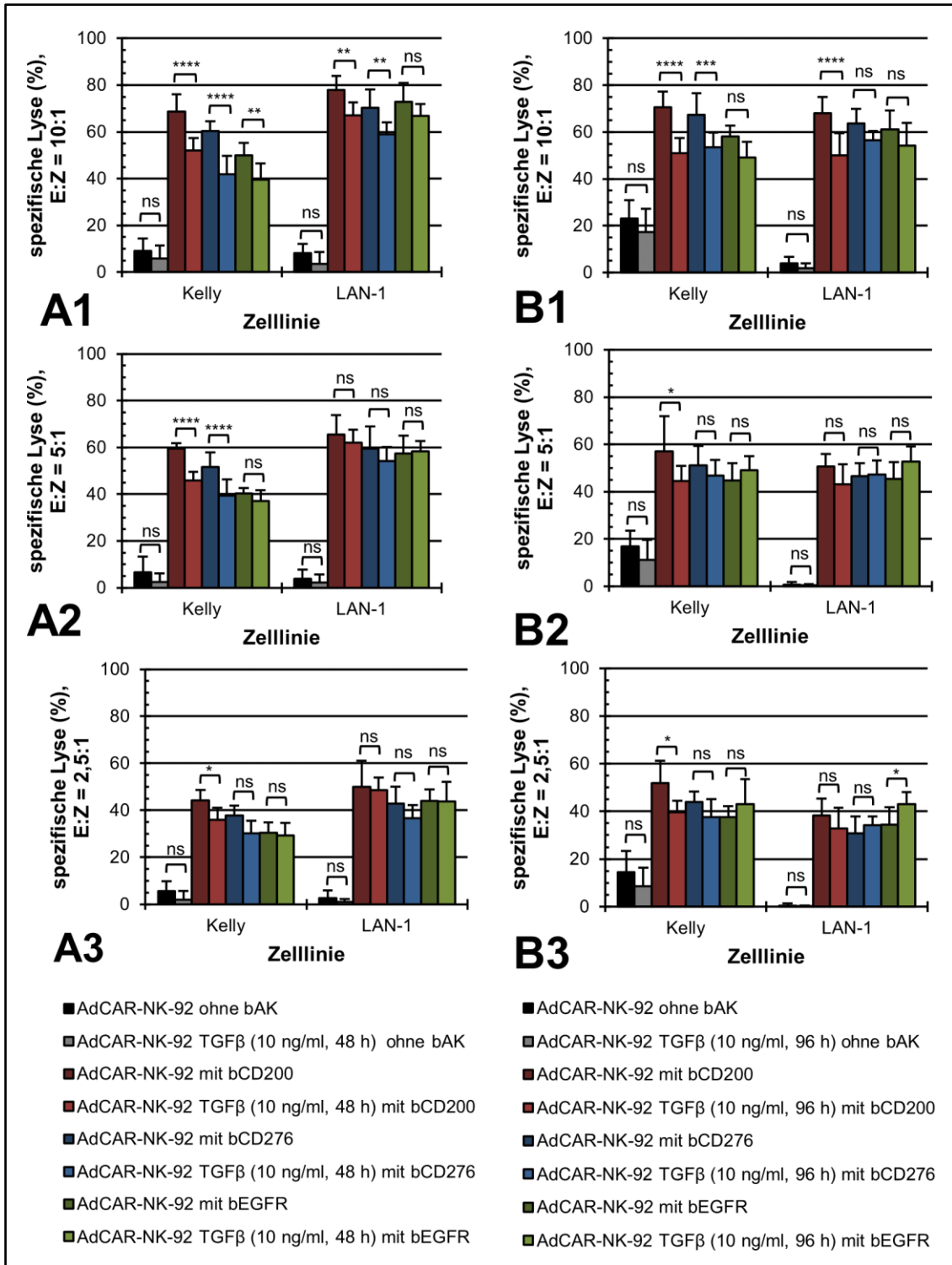


Abbildung 7: Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit 10 ng/ml TGFβ.

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly- und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart verschiedener bAK (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor dem Test für 48 h (A) oder 96 h (B) mit 10 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzellverhältnis von 10:1 (A1, B1), 5:1 (A2, B2) und 2,5:1 (A3, B3; Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3; **** p ≤ 0,0001, *** p ≤ 0,001, ** p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche).

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen von der Konzentration des eingesetzten TGF β abhängt, wurde die TGF β -Konzentration in den folgenden Calcein-Release-Tests auf 50 ng/ml erhöht. Nachfolgend werden erneut die Zytotoxizitätswerte der Effektor- zu Zielzellverhältnisse von 10:1 näher dargestellt.

Auch bei gesteigerter TGF β -Konzentration wurde eine Abnahme der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen beobachtet.

Bei der Zelllinie Kelly wurde mit bAK gegen CD200 und CD276 eine signifikante Verminderung der spezifischen Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit 50 ng/ml TGF β festgestellt. Der größte Unterschied der AdCAR-spezifischen Zytotoxizität wurde mit bAK gegen CD200 beobachtet: Verglichen mit dem Kontrollwert (66,70 % \pm 9,47 %) wurde hier eine Abnahme der spezifischen Zytotoxizität auf 46,80 % \pm 9,57 % gemessen. Bei Verdoppelung der Inkubationszeit mit TGF β auf 96 h wurden mit bAK gegen CD200 und EGFR signifikant herabgesetzte Zytotoxizitätswerte der AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber Kelly-Zellen festgestellt.

Gegen LAN-1 Zellen wurde nur mit bAK gegen CD200 eine signifikant verringerte spezifische Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Co-Inkubation mit 50 ng/ml TGF β beobachtet: Gegenüber dem Kontrollwert von 72,07 % \pm 6,08 % lag die spezifische Zytotoxizität nach Inkubation mit TGF β hier nur noch bei 63,01 % \pm 6,79 %. Nach 96 h Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β konnte im Vergleich mit den Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied der spezifischen Zytotoxizität gegenüber LAN-1-Zellen beobachtet werden.

Insgesamt konnte bei Einsatz von TGF β in der Konzentration 50 ng/ml nur in fünf von 16 Experimenten ein statistisch signifikanter Unterschied der Zytotoxizitätswerte gegenüber den Kontrollwerten nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit der Zytotoxizitätsabnahme von der Inkubationszeit der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β oder ein signifikanter Unterschied der intrinsischen Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen wurde auch nach Inkubation mit 50 ng/ml TGF β nicht beobachtet.

Damit zeigen diese Experimente, dass die Funktionalität von AdCAR NK-92 Zellen durch Inkubation mit TGF β nur partiell bzw. geringfügig beeinflusst wurde.

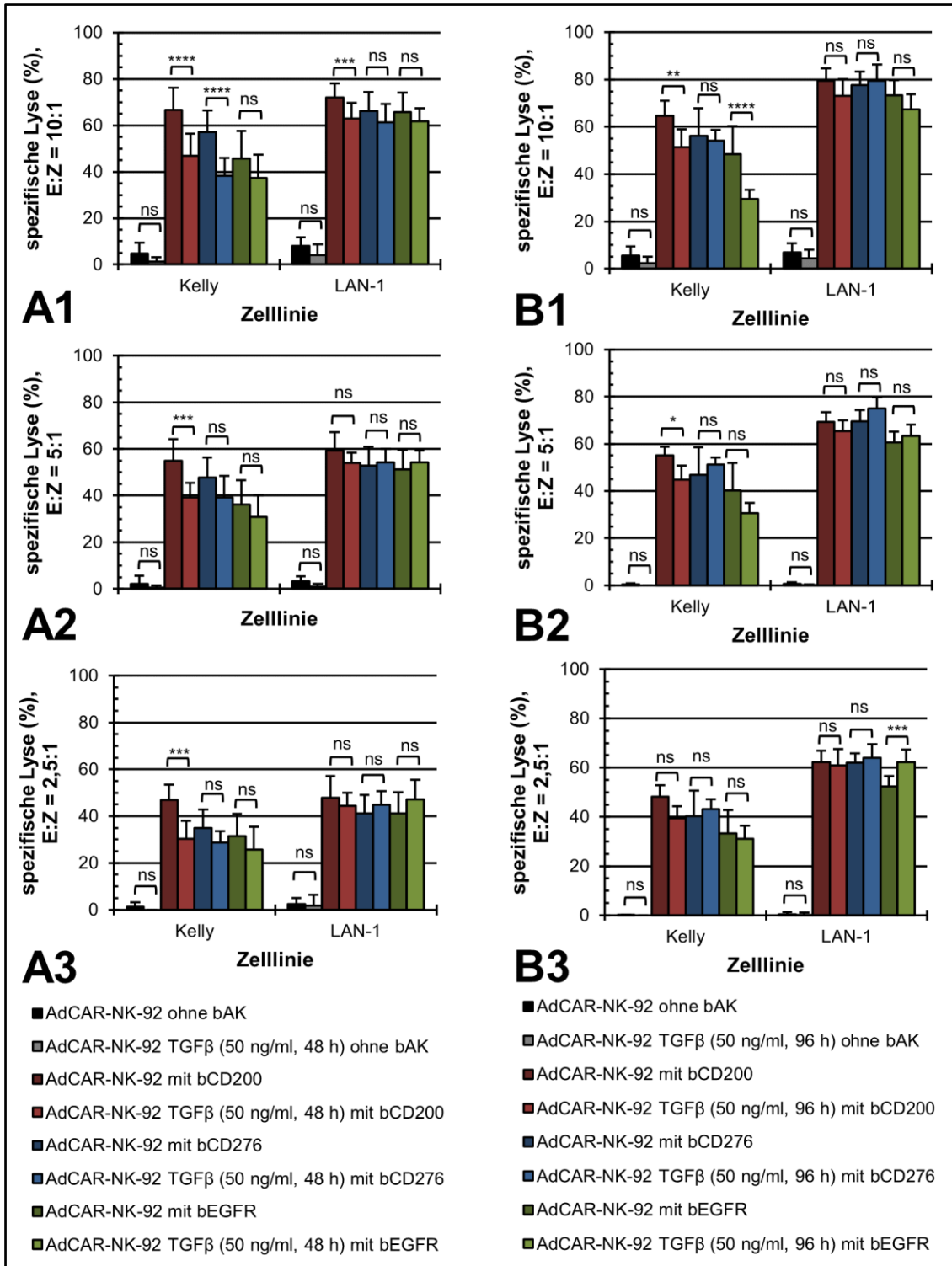


Abbildung 8: Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit 50 ng/ml TGFβ.

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly- und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart verschiedener bAK (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor dem Test für 48 h (**A**) oder 96 h (**B**) mit 50 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 (**A1, B1**), 5:1 (**A2, B2**) und 2,5:1 (**A3, B3**; Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3; **** p ≤ 0,0001, *** p ≤ 0,001, ** p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.2.4 Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib

Um zu untersuchen, ob die Verringerung des zytotoxischen Potenzials der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β durch Verwendung des TGF β -Rezeptor-1-Inhibitors Galunisertib reversibel ist, wurden Calcein-Release-Tests mit bAK gegen die Antigene CD276 und GD2 durchgeführt. Als Zielzellen wurden die Neuroblastom-Zelllinien LAN-1 und LS eingesetzt. Vor Durchführung der Tests wurden AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β in der Konzentration 10 ng/ml und Galunisertib in der Konzentration 5 μ M behandelt. In drei Ansätzen wurden die Zellen entweder für 48 h nur mit TGF β oder 48 h mit TGF β und Galunisertib beziehungsweise 48 h mit TGF β und 24 h mit Galunisertib inkubiert. Im Folgenden werden die Zytotoxizitätswerte des E:Z-Verhältnis von 10:1 näher betrachtet.

Bei 48-stündiger Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β wurde wieder eine verringerte spezifische Zytotoxizität gegenüber den Zelllinien LAN-1 und LS beobachtet: Bei der Zelllinie LAN-1 war diese Abnahme der Zytotoxizität allerdings nur mit bAK gegen GD2 statistisch signifikant. Hier wurde ein spezifischer Zytotoxizitätswert der AdCAR-NK-92-Kontrolle von 47,74 % \pm 6,05 % beobachtet, der signifikant über dem spezifischen Zytotoxizitätswert nach Inkubation mit TGF β (35,55 % \pm 9,79 %) lag. Gegenüber der Zelllinie LS wurde bei Verwendung von bAK gegen CD276 und GD2 ein statistisch signifikanter Unterschied der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β beobachtet.

Demgegenüber konnte bei Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit TGF β und Galunisertib für 48 h bzw. mit TGF β für 48 h und Galunisertib für 24 h kein statistisch signifikanter Unterschied der spezifischen AdCAR-vermittelten Zytotoxizitätswerte im Vergleich mit den Kontrollwerten festgestellt werden.

Unabhängig von einer Inkubation mit TGF β oder Galunisertib wurde erneut kein signifikanter Unterschied der intrinsischen Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber den Zelllinien LAN-1 oder LS beobachtet.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Galunisertib in der Lage ist die TGF β -induzierte Einschränkung der Funktionalität zumindest zu reduzieren. Allerdings

lässt sich aufgrund des geringen Mittelwertunterschieds der Zytotoxizitätswerte zwischen Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen, AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib mit den gegebenen Standardabweichungen keine endgültige Aussage zur Auswirkung des TGF β -Rezeptor-1-Inhibitors Galunisertib auf die Funktionalität von mit TGF β -inkubierten AdCAR-NK-92-Zellen treffen.

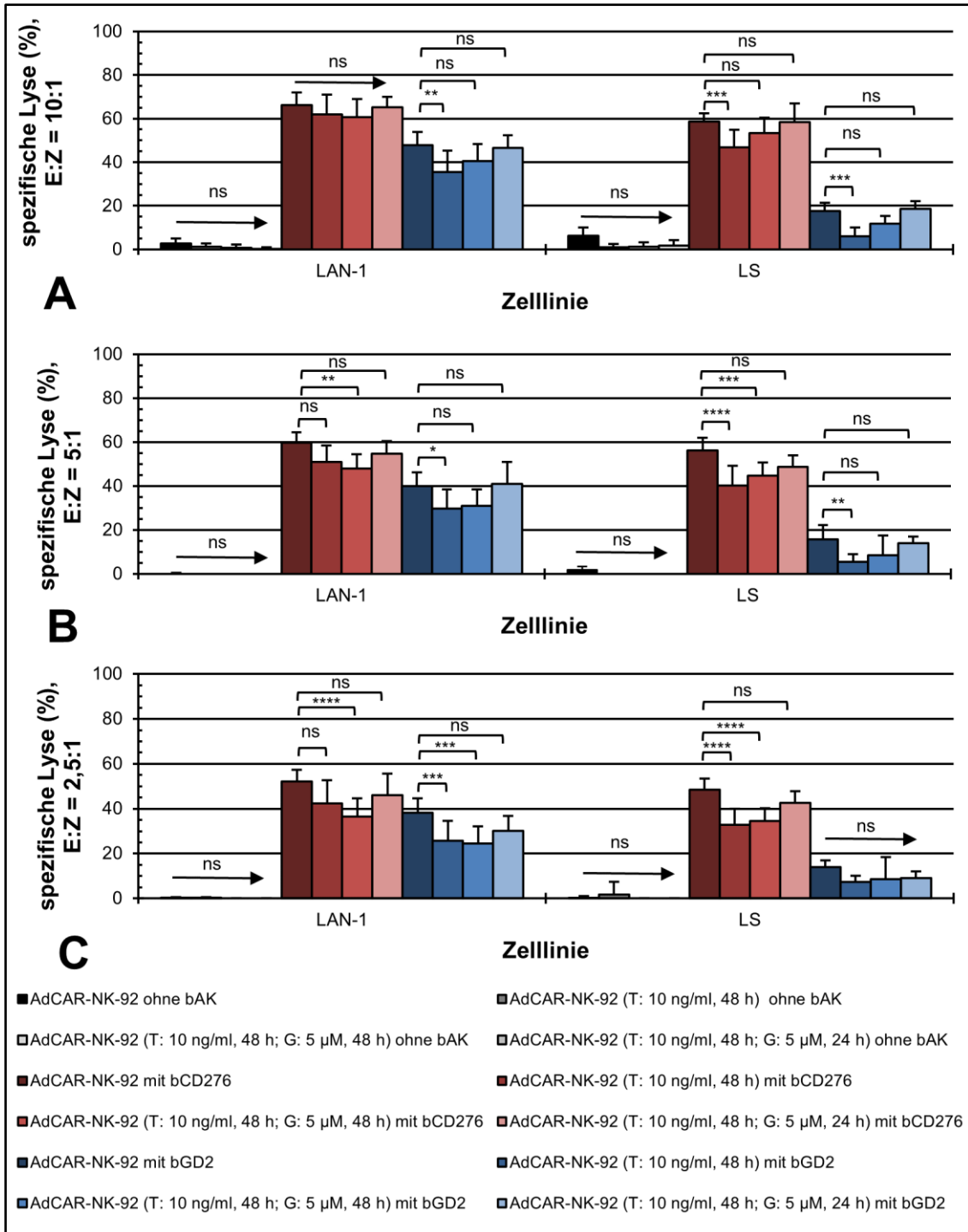


Abbildung 9: **Calcein-Release-Tests der Adapter-CAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1- und LS-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher biotinylierter Antikörper (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor dem Test 48 h mit 10 ng/ml TGF β alleine (T: 10 ng/ml, 48 h) oder in Kombination mit 5 µM Galunisertib für 48 h (T: 10 ng/ml, 48 h & G: 5 µM, 48 h) oder 24 h (T: 10 ng/ml, 48 h & G: 5 µM, 24 h) kokultiviert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 (A), 5:1 (B), und 2,5:1 (C; Mittelwerte \pm SDvM, n \geq 3; **** p \leq 0,0001, *** p \leq 0,001, ** p \leq 0,01, * p \leq 0,05, ns p \geq 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.3 Untersuchung des Effekts von Bestrahlung auf AdCAR-NK-92-Zellen

3.3.1 Bestimmung der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy

Bevor der Effekt der Bestrahlung mit 10 Gy auf die Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen untersucht werden konnte, wurde ermittelt, ob und ab welchem Zeitpunkt die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen durch Bestrahlung beeinträchtigt wird. Dafür wurden AdCAR-NK-92-Zellen mit der Energiedosis 10 Gy bestrahlt und bis zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der bestrahlten AdCAR-NK-92-Zellen mit MTS-Tests bestimmt.

Unmittelbar nach der Bestrahlung betrug die Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen 96,24 % \pm 4,83 % und unterschied sich damit nicht signifikant von der Viabilität der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen. Im zeitlichen Verlauf lag die Viabilität 24 h nach Bestrahlung bei 61,13 % \pm 7,59 %, 48 h nach Bestrahlung bei 27,99 % \pm 9,31 % und 72 h nach Bestrahlung bei 10,05 % \pm 4,55 %. Nach 96 h lag die Viabilität bestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen nur noch bei 1,29 % \pm 2,29 %. Abgesehen vom Viabilitätswert der AdCAR-NK-92-Zellen unmittelbar nach Bestrahlung waren diese Viabilitätswerte jeweils signifikant geringer als die Werte der unbestrahlten Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen mit zunehmender Stundenanzahl kontinuierlich rückläufig war. Lediglich unmittelbar nach Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 h wurde kein signifikanter Unterschied der Viabilität bestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen zur Viabilität der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen festgestellt.

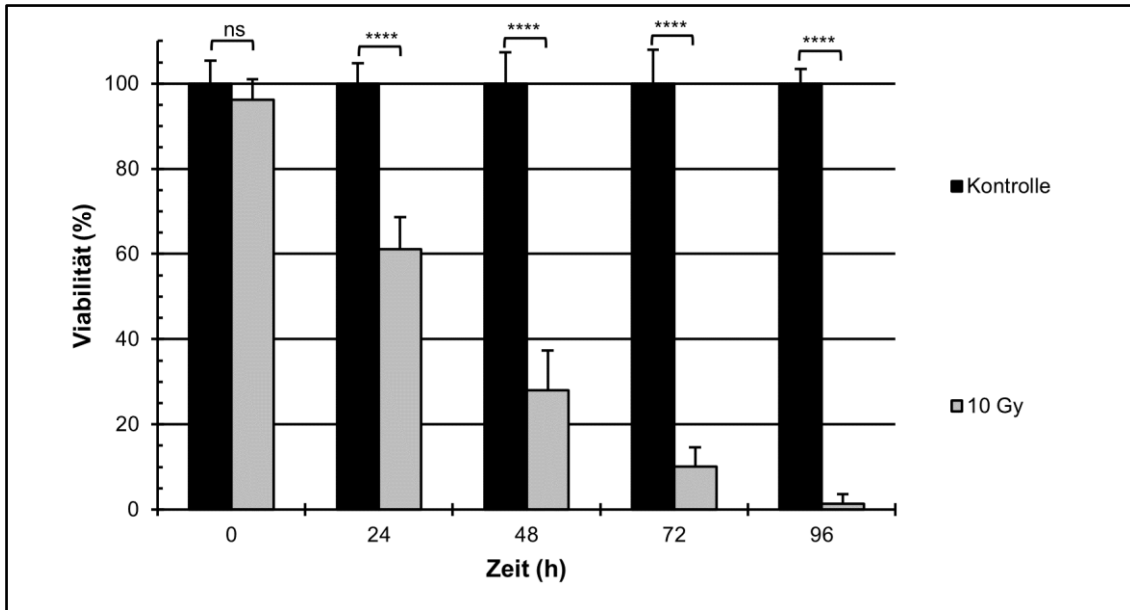


Abbildung 10: Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.

AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und bis zum angegebenen Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) kultiviert. Die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde durch Ermittlung der Absorption nach 2 h Inkubation mit Celltiter 96® Reagenz bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben (Mittelwerte \pm SDvM, n = 3, * $p \leq 0,01$, ns $p \geq 0,05$; multiple T-Tests mit Holm-Sidak Methode zur Korrektur multipler Vergleiche).

3.3.2 Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10Gy

Die Auswirkungen einer Bestrahlung mit der Energiedosis 10 Gy auf die Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde mit Calcein-Release-Tests untersucht, um zu ermitteln, ob und ab wann sich die Bestrahlung auf die Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen auswirkt. Die Zelllinien LAN-1 und LS wurden als Zielzellen eingesetzt und mit bAK gegen die Antigene CD276 und GD2 inkubiert. Die Tests wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung der AdCAR-NK-92-Zellen mit 10 Gy durchgeführt. Unbestrahlte AdCAR-NK-92-Zellen dienten als Kontrolle. Da bei Verringerung des Effektor- zu Zielzellverhältnisses eine entsprechende Abnahme der Zytotoxizitätswerte beobachtet wurde, werden im Folgenden stellvertretend die Ergebnisse des E:Z-Verhältnis von 10:1 im Detail besprochen.

Insgesamt konnte im zeitlichen Verlauf eine kontinuierliche Abnahme der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy beobachtet werden. Analog zur Untersuchung der Viabilität wurde unmittelbar nach der Bestrahlung kein signifikanter Unterschied der Zytotoxizitätswerte bestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen im Vergleich zu den Werten unbestrahlter Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen beobachtet. Die größte Abnahme der Zytotoxizität von bestrahlten AdCAR-NK-92-Zellen wurde 24 h bzw. 48 h nach der Bestrahlung beobachtet. Beispielhaft dafür wurde bei der Zelllinie LAN-1 mit bAK gegen CD276 unmittelbar nach Bestrahlung ein spezifischer Zytotoxizitätswert von $68,88 \% \pm 6,12 \%$ gemessen, der sich nicht signifikant vom spezifischen Zytotoxizitätswert der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen ($68,82 \% \pm 7,96 \%$) unterschied. Im zeitlichen Verlauf wurde dann eine Abnahme der Zytotoxizität beobachtet, so dass die spezifischen Zytotoxizitätswerte der bestrahlten AdCAR-NK-92-Zellen mit bAK gegen CD276 zu den Zeitpunkten 24 h ($47,48 \% \pm 5,15 \%$) und 48 h nach Bestrahlung ($15,37 \% \pm 5,66 \%$) jeweils signifikant unter dem Kontrollwert unbestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen ($68,82 \% \pm 7,96 \%$) lagen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung zunächst ihr volles zytotoxisches Potenzial entfalten konnten und erst mit voranschreitender Zeit darin eingeschränkt wurden.

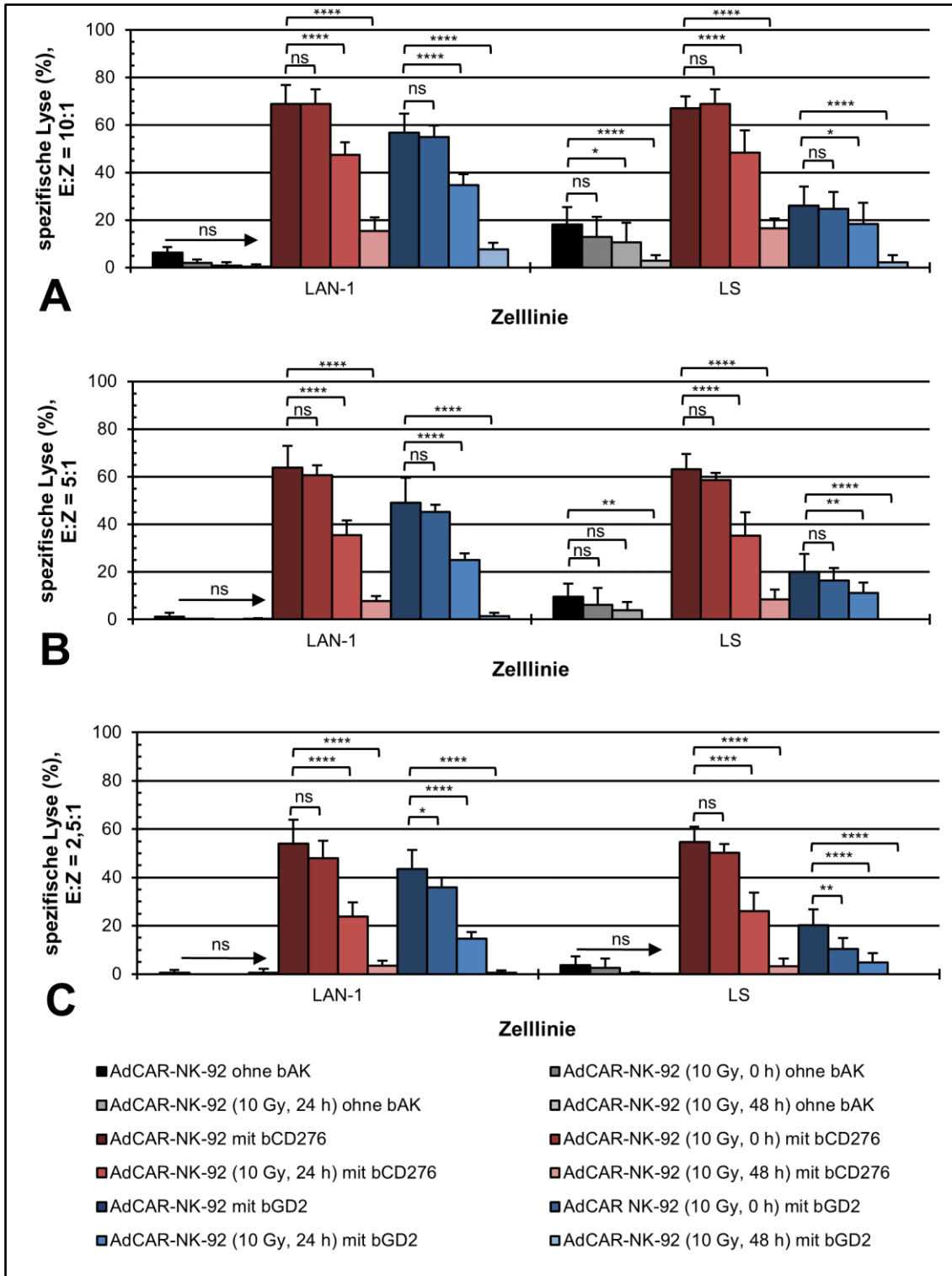


Abbildung 11: **Calcein-Release-Tests der AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.** AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1- und LS-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher bAK (25 µg/ml). Die Tests wurden mit AdCAR-NK-92-Zellen 0 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy durchgeführt. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 (A), 5:1 (B) und 2,5:1 (C; Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3; **** p ≤ 0,0001, ** p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.4 Untersuchungen zur pharmakologischen Kontrolle der AdCAR-Funktionalität

3.4.1 Bestimmung der Viabilität und Proliferation von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib

Im Hinblick auf die pharmakologische Kontrolle der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib wurden zunächst die Auswirkungen von Dasatinib auf die Viabilität und Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen mithilfe einer Trypanblau-Vitalfärbung untersucht. Dafür wurden AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib (1 nM, 10 nM, 100 nM) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) analysiert.

Unabhängig vom Beobachtungszeitraum und der verwendeten Dasatinib-Konzentration wurde verglichen mit der Kontrolle kein signifikanter Unterschied der Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib beobachtet. Auch für die Proliferationswerte konnte unabhängig vom Beobachtungszeitraum und der verwendeten Dasatinib-Konzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der unbehandelten AdCAR-NK-92-Zellen und der mit Dasatinib kultivierten AdCAR-NK-92-Zellen festgestellt werden.

Diese Experimente zeigen, dass weder die Viabilität noch die Proliferationsrate der AdCAR-NK-92-Zellen signifikant von einer Inkubation mit Dasatinib beeinflusst wurden.

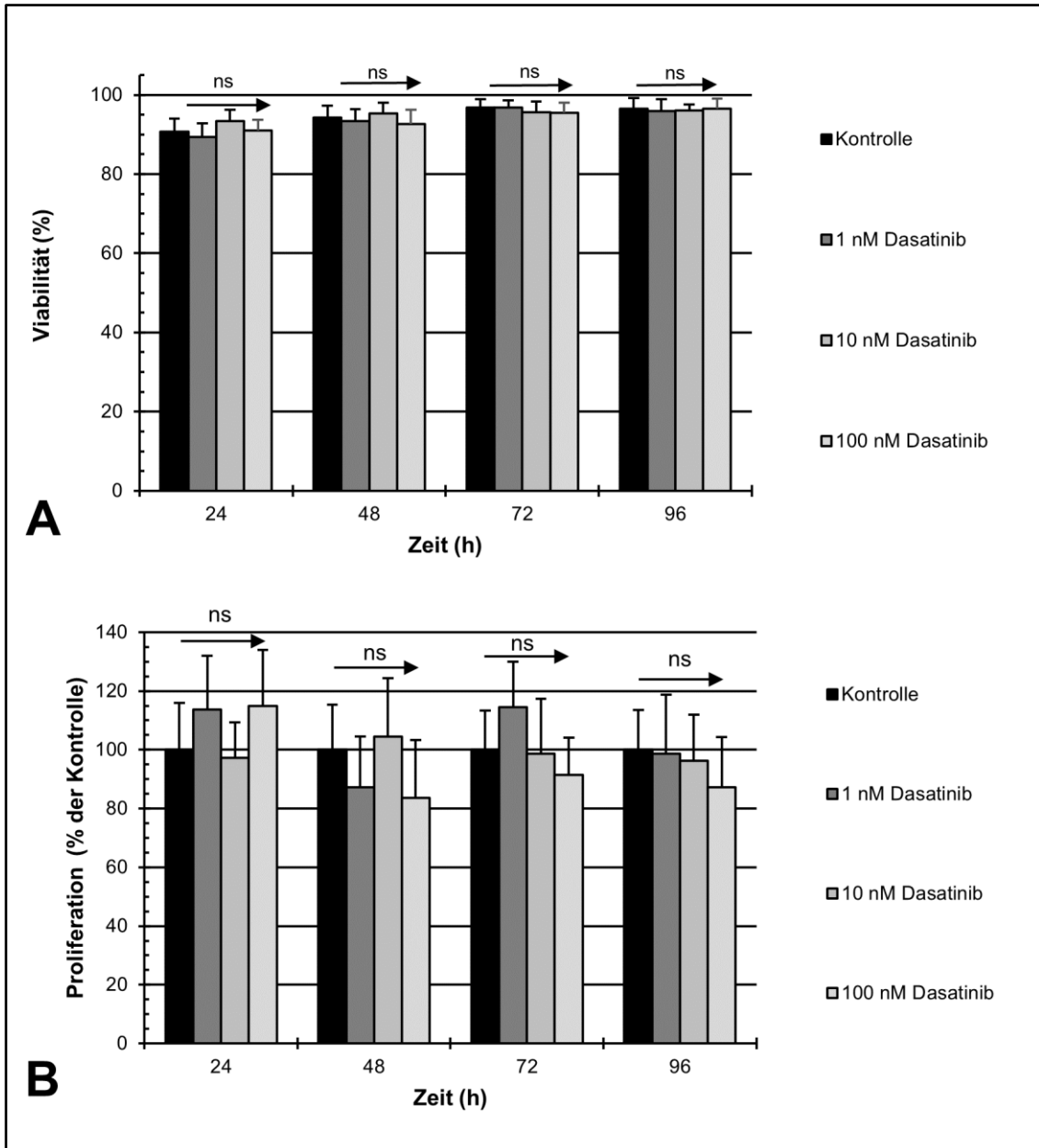


Abbildung 12: **Viabilität und Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit verschiedenen Dasatinib-Konzentrationen inkubiert und alle 24 h mit Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Das Lösungsmittel DMSO wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. **A:** Die Zellviabilität berechnet sich aus dem Anteil der lebenden AdCAR-NK-92-Zellen an der Gesamtzahl (Mittelwerte \pm SDvM, $n = 3$, $ns \ p \geq 0,05$; zwei faktorielle Varianzanalyse mit Dunnet-post-hoc Test für multiple Vergleiche). **B:** Die Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen ergibt sich aus der Anzahl an lebenden Zellen in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in Prozent (Mittelwerte \pm SDvM, $n = 3$, $ns \ p \geq 0,05$; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Dunnet post-hoc Test für multiple Vergleiche).

3.4.2 FACS-basierte Charakterisierung der Adapter-CAR-Expression in Gegenwart von Dasatinib

Die Auswirkungen einer 24-stündigen Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib auf die Expression des AdCARs wurde durchflusszytometrisch untersucht. AdCAR-NK-92-Zellen wurden für 24 h mit Dasatinib in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM inkubiert und anschließend auf die Expression des Antigens CD271 untersucht, das als Markergen mit dem AdCAR koexprimiert wurde. Der Anteil positiver Zellen (PPZ) und die MFI sind in Tabelle 3 farbcodiert dargestellt.

Unabhängig von einer Inkubation mit Dasatinib konnte in der durchflusszytometrischen Untersuchung keine verringerte Expression des CARs auf der Zelloberfläche von AdCAR-NK-92-Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil von AdCAR-NK-92-Zellen, die den AdCAR exprimieren, lag bei Inkubation mit Dasatinib in der Konzentration 10 nM bei 99,9 % und bei Inkubation mit Dasatinib in der Konzentration 100 nM bei 100,0 % und war damit gleichwertig zum Anteil AdCAR-exprimierender Kontrollzellen von 100,0 %.

Mit MFI-Werten von 780,65 bei Dasatinib in der Konzentration 10 nM und von 630,61 bei 100 nM Dasatinib ist die Antigendichte des AdCARs auf behandelten AdCAR-NK-92-Zellen sehr hoch und verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, deren MFI-Wert 556,17 betrug, sogar leicht erhöht.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die AdCAR-Expression durch Inkubation mit Dasatinib nicht eingeschränkt wurde.

Tabelle 17: **Durchflusszytometrische Analyse der AdCAR-Expression der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden für 24 h mit Dasatinib (10 nM, 100 nM) inkubiert. Dann wurde die Expression des Markergens CD271, das mit dem AdCAR koexprimiert wird, bestimmt. Dargestellt ist der Anteil an CD271 positiven Zellen (PPZ) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Farbcodierung stellt die Zunahme der Messwerte von Rot über Gelb nach Grün dar (siehe Legende).

Antigen	Funktion	Antigen-expression	AdCAR-NK-92 Kontrolle	AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM, 24 h)	AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM, 24 h)
CD271	AdCAR-Markergen	PPZ	100,0%	99,9%	100,0%
		MFI	556,2	780,6	630,6

Legende	sehr niedrig	niedrig	moderat	hoch	sehr hoch
---------	--------------	---------	---------	------	-----------

3.4.3 Bestimmung der Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib

Um zu untersuchen, ob sich die Funktionalität des AdCAR-Konstrukts durch Dasatinib inhibieren lässt, wurden Calcein-Release-Tests mit der Neuroblastom-Zelllinie LAN-1 und bAK gegen CD276 und EGFR durchgeführt, bei denen Dasatinib in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM oder 100 nM im Zellkulturmedium eingesetzt wurde. Da bei Verringerung des E:Z-Verhältnisses auch eine Abnahme der AdCAR-spezifischen Zytotoxizität beobachtet wurde, wird im Folgenden nur auf die Werte des E:Z-Verhältnisses von 10:1 eingegangen.

Ein signifikanter Unterschied der Zytotoxizitätswerte von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib im Vergleich zu den Werten von Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen wurde ab einer Dasatinib-Konzentration von 10 nM beobachtet. Bei Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib in der Konzentration 1 nM konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten festgestellt werden. Einzig der spezifische Zytotoxizitätswert von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit 1 nM Dasatinib mit bAK gegen CD276 ($48,12 \% \pm 4,54 \%$) war signifikant geringer als der Wert der Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen ($57,14 \% \pm 4,49 \%$). Wurden AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib in der Konzentration 10 nM inkubiert, konnte im Vergleich mit den Kontroll-AdCAR-NK-92-Zellen eine Einschränkung der Zytotoxizität auf weniger als die Hälfte beobachtet werden. Bei einer Dasatinib Konzentration von 100 nM war keine relevante Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber LAN-1 Zellen mehr nachweisbar. Beispielhaft dafür wurde nach Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit 1 nM Dasatinib und Kombination mit einem bAK gegen EGFR eine spezifische Zytotoxizität von $60,80 \% \pm 4,61 \%$ gemessen, die sich nicht signifikant von der spezifischen Zytotoxizität unbehandelter AdCAR-NK-92-Zellen unterschied ($62,55 \% \pm 4,48 \%$). Nach Inkubation mit 10 nM Dasatinib betrug die spezifische Zytotoxizität nur noch $30,63 \% \pm 5,69 \%$ und bei Inkubation mit 100 nM Dasatinib war keine nennenswerte AdCAR-vermittelte, spezifische Zytotoxizität mehr messbar ($0,08 \% \pm 0,25 \%$). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass mit dieser Dasatinib-Konzentration die Funktion des AdCAR-Konstrukts vollständig inhibiert wurde.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation der AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib eine dosisabhängige Abnahme von intrinsischer und AdCAR-vermittelter spezifischer Zytotoxizität gegenüber der Zelllinie LAN-1 erreicht wurde.

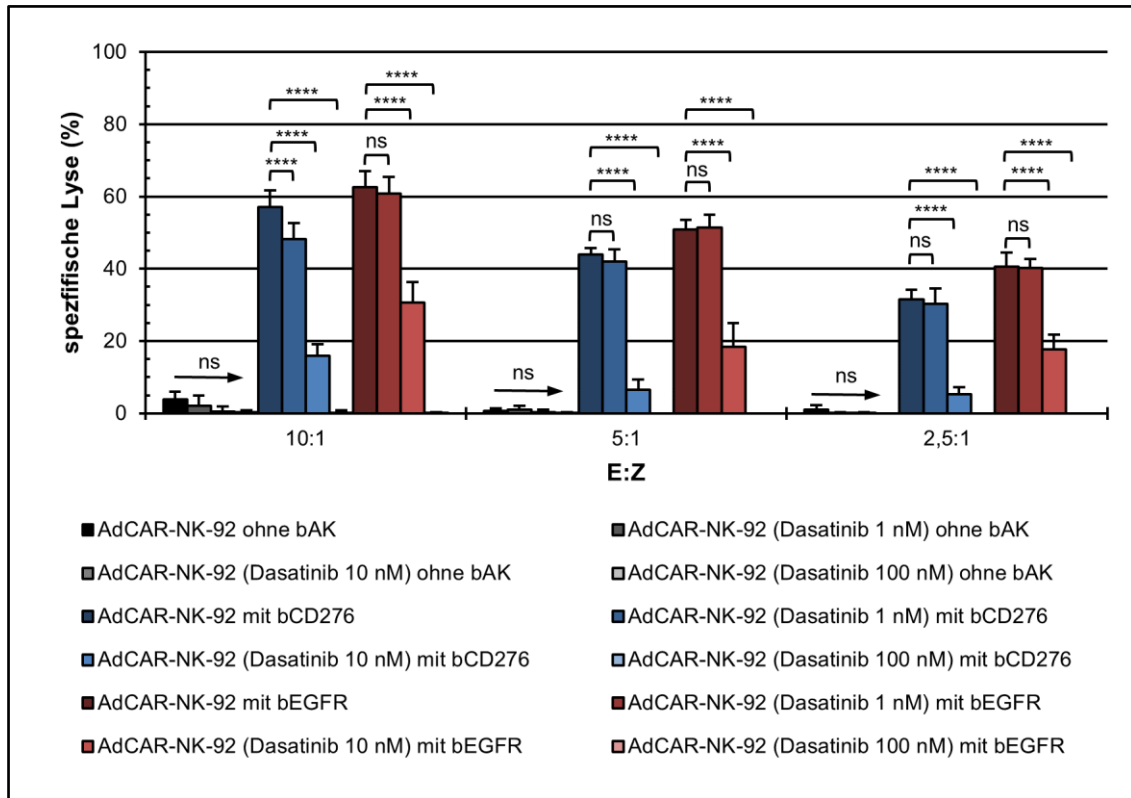


Abbildung 13: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib.** AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher biotinylierter Antikörper (25 µg/ml). Die Tests wurden in Medium mit Dasatinib (1 nM, 10 nM, 100 nM) und ohne Dasatinib durchgeführt. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n = 3; **** p ≤ 0,0001, ** p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05, ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleich).

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt der eingeschränkten bzw. vollständig inhibierten Zytotoxizität bei Inkubation von AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib permanent oder vorübergehend ist, wurden AdCAR-NK-92-Zellen für 24 h mit Dasatinib in den Konzentration 10 nM und 100 nM kultiviert und anschließend 24 h ohne Dasatinib kultiviert, bevor ihre Funktionalität in Calcein-Release-Tests bestimmt wurde. Die Dasatinib-Konzentrationen von 10 nM und 100 nM wurden ausgewählt, da mit diesen bereits eine signifikante Einschränkung der Zytotoxizität erreicht wurde. Die Tests wurden erneut mit bAK

gegen die Antigene CD276 und EGFR und der Zelllinie LAN-1 als Zielzellen durchgeführt.

Verglichen mit den Kontrollwerten konnte unabhängig von der eingesetzten Dasatinib-Konzentration keine signifikante Veränderung der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen, die erst 24 h mit Dasatinib und anschließend 24 h ohne Dasatinib kultiviert wurden, festgestellt werden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der beiden Experimente auf eine vorübergehende, dosisabhängige Hemmung der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib hin, welcher somit zur pharmakologischen Kontrolle der AdCAR-Funktion genutzt werden kann.

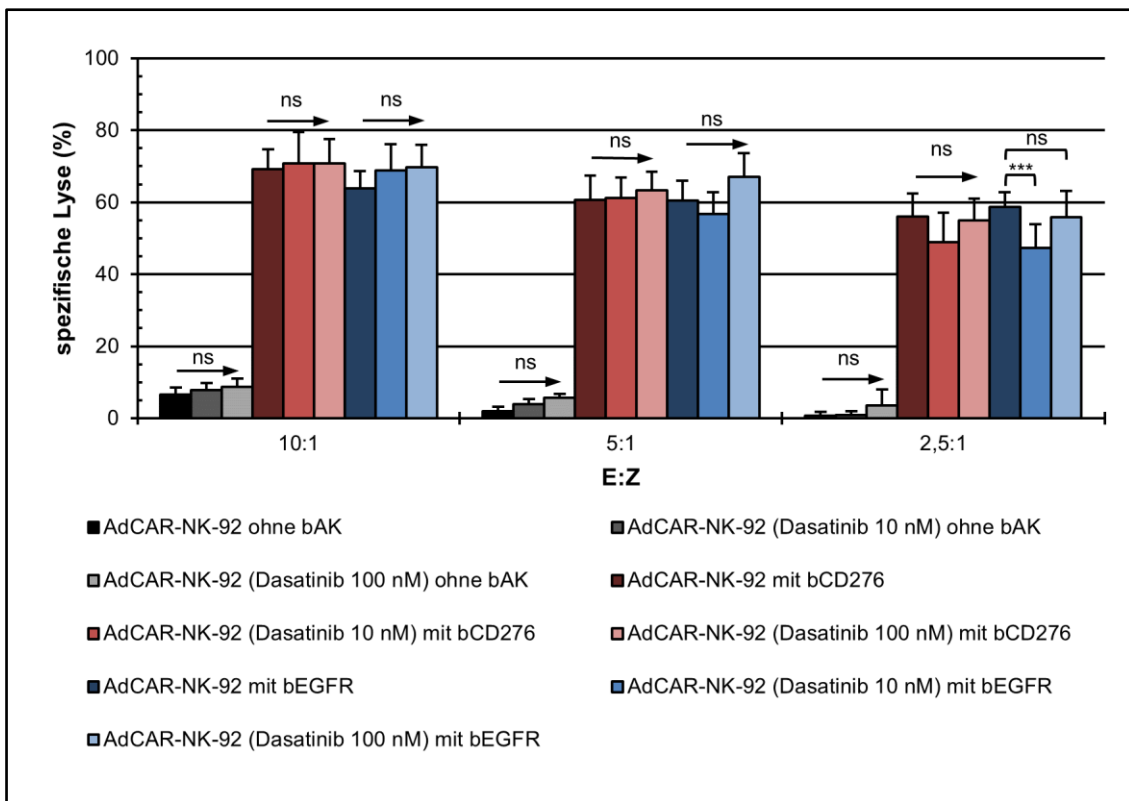


Abbildung 14: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92 Zellen nach Vorinkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92 induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher biotinylierter Antikörper (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests zunächst 24 h mit Dasatinib (10 nM, 100 nM) inkubiert und anschließend weitere 24 h ohne Dasatinib kultiviert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n = 3; ns p ≥ 0,05; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-hoc Test für multiple Vergleich).

4 Diskussion

4.1 Eigenschaften der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie und Funktionstestung am Beispiel des Neuroblastoms

4.1.1 Eigenschaften der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie

Die Adapter-CAR-NK-92-basierte zelluläre Immuntherapie ist eine neue Behandlungsstrategie zur Therapie maligner Erkrankungen und verbindet die Spezifität monoklonaler Antikörper mit der Funktionalität chimärer Antigenrezeptoren und den Vorteilen der immortalisierten NK-92-Zelllinie.

Immunevasionsmechanismen des Tumors stellen eine Hürde CAR-basierter Immuntherapie dar, die mithilfe eines universellen CAR-Systems wie dem Adapter-CAR-System überwunden werden kann, da AdCAR-exprimierende Immunzellen in Kombination mit entsprechenden bAK in der Lage sind, mehrere TAAs simultan oder sequenziell zu erkennen (Seitz et al., 2018; Grote et al., 2020b; Darowski et al., 2019). Ein entscheidender Bestandteil universeller CAR-Systeme sind Adaptermoleküle, da diese TAA-spezifisch sind und den Kontakt zwischen Tumorzelle und CAR-exprimierender Immunzelle herstellen (Darowski et al., 2019). Im Rahmen des Adapter-CAR-Systems wurden mAK als Adaptermoleküle eingesetzt. Diese ermöglichen neben der spezifischen Erkennung zahlreicher Antigene als Zielstruktur auch eine zeitnahe Translation in die Klinik, da bereits über 50 Antikörper vom Typ IgG von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) für die therapeutische Anwendung zugelassen sind und sich mehr als 80 weitere in klinischen Phase-I- bis Phase-III-Studien befinden (Strohl, 2018; Darowski et al., 2019). Am Beispiel des zugelassenen mAK Rituximab demonstrierten *Grote et al.*, dass durch Biotinylierung von mAK funktionale Adaptermoleküle für die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie hergestellt werden können (Grote et al., 2020b). Ein weiterer Bestandteil universeller CAR-Systeme sind Signalmoleküle, die an das TAA-spezifische Adaptermolekül gekoppelt sind und die Bindung zum CAR vermitteln (Darowski et al., 2019). Die Auswahl des Signalmoleküls ist entscheidend, da körperfremde Moleküle eine immunogene Reaktion auslösen können und damit eine Herausforderung auf dem Weg in Richtung klinischer Anwendung darstellen (Darowski et al., 2019; Grote et al., 2020b). In verschiedenen Arbeiten wurde das

endogene Vitamin Biotin durch Kopplung an Adaptermoleküle bereits erfolgreich als Signalmolekül für Avidin- bzw. Streptavidin-basierte universelle CAR-Systeme eingesetzt (Urbanska and Powell, 2012; Lohmueller et al., 2018). Obwohl diese modifizierten Varianten von Avidin und Streptavidin gut geeignet sind, um biotinylierte Adaptermoleküle zu binden, ist der therapeutische Einsatz in Frage zu stellen, da das Risiko einer immunogenen Reaktion gegenüber diesen nicht-humanen Proteinen besteht (Darowski et al., 2019). Im Gegensatz dazu basiert das Adapter-CAR-System auf den Eigenschaften eines neuartigen scFv und bindet an ein *Label-Linker-Epitop* genanntes Neo-Epitop, das aus Biotin im Kontext der Bindung an einen mAK und nicht aus Biotin selbst besteht (European Patent Application EP3315511A1, 2016; Grote et al., 2020b). Die Spezifität der Bindung des CARs an das Neoepitop biotinylierter Antikörper wurde von *Grote et al.* demonstriert: AdCAR-NK-92-Zellen behielten ihr zytotoxisches Potenzial auch in Gegenwart von ungebundenem Biotin in supraphysiologischen Konzentrationen (Grote et al., 2020b). Da die Antigenspezifität der AdCAR-NK-92-basierten Immuntherapie nicht auf den AdCAR-NK-92-Zellen selbst beruht, sondern durch die entsprechenden bAK zustande kommt, müssen AdCAR-NK-92-Zellen nicht patientenindividuell modifiziert werden und können als standardisiertes Produkt kosteneffizient und GMP-konform in großen Mengen angereichert und gebrauchsfertig verabreicht werden (Tam et al., 2003; Zhang et al., 2017; Grote et al., 2020b). Darüber hinaus besitzen sie im Vergleich mit anderen CAR-exprimierenden Immunzellen ein günstiges Sicherheitsprofil, auf das im Zusammenhang der Bestrahlung und der pharmakologischen Kontrollmöglichkeiten von AdCAR-NK-92-Zellen detailliert eingegangen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie am Beispiel des Neuroblastoms im Hinblick auf Hürden bei der Therapie solider Tumore, die Auswirkungen von Bestrahlung auf die Funktionalität und die Möglichkeit pharmakologischer Kontrolle mit Dasatinib getestet.

4.1.2 Antigenexpression verschiedener Neuroblastom-Zelllinien

Für die Bestimmung der Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen wurden Neuroblastom-Zelllinien ausgewählt, da das Neuroblastom ein solider, pädiatrischer Tumor ist, der für die Patienten der Hochrisiko-Gruppe trotz intensiver Therapie mit einer Fünfjahresrate progressionsfreien Überlebens von kleiner als 50 % einhergeht und stetiger Bedarf nach innovativen Therapieansätzen besteht (Cohn et al., 2009). Neuroblastome exprimieren zahlreiche Antigene wie GD2 oder CD276 (B7-H3), die im Rahmen der Immuntherapie bereits teilweise als Zielstrukturen verwendet werden (Sawaisorn et al., 2020).

Zunächst wurden die etablierten Neuroblastom-Zelllinien IMR-32, Kelly, LAN-1, LS, SH-SY5Y, SK-N-AS und SK-N-BE durchflusszytometrisch auf ihre Expression der Antigene CD146 (MCAM), CD171 (L1CAM), CD221 (IGF-1R) CD246 (ALK) und CD271 (LNGFR) untersucht, um geeignete Zielstrukturen für die Funktionstestung der AdCAR-NK-92-Zellen zu finden. Verglichen mit der Literatur zeigten sich bei der durchflusszytometrischen Analyse der Antigenexpression vor allem Übereinstimmungen. Das Antigen CD146 ist für seine breite Expression auf soliden, pädiatrischen Tumoren bekannt und wurde im Einklang mit den Ergebnissen von *Canzonetta et al.* auch in dieser Arbeit auf allen untersuchten Neuroblastom-Zelllinien relevant exprimiert (Orentas et al., 2012; Canzonetta et al., 2021). Auch für CD171 ist eine Expression auf neuroektodermalen Tumoren und vor allem Neuroblastomen beschrieben (Rawnaq et al., 2012). In Übereinstimmung mit den Arbeiten von *Schönmann et al.* und *Hoefnagel et al.* wurde CD171 mit Ausnahme der Zelllinie LS auf allen untersuchten Zelllinien exprimiert (Schönmann et al., 1986; Hoefnagel et al., 2001). Die Expression von CD221 (IGF-1R) auf Neuroblastom-Zellen ist mit vermehrter Aktivierung wachstumsfördernder und Apoptose-verhindernder Signalwege assoziiert (El-Badry et al., 1989). Auf den untersuchten Zelllinien wurde CD221 nur selektiv und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Singleton et al.* vor allem auf der Zelllinie SH-SY5Y exprimiert (Singleton et al., 1996). Auch CD271 wurde selektiv auf vier der sieben Neuroblastom-Zelllinien exprimiert. Allerdings ist die Bedeutung der Expression von CD271 auf

Neuroblastomen nicht eindeutig: Während *Morandi et al.* und *Hansford et al.* CD271 auf Tumorzellen nachweisen konnten, die Knochenmark-infiltrierenden Hochrisiko-Neuroblastomen entstammten, geht die Expression von CD271 laut *Schulte et al.* mit vermehrter Differenzierung der Neuroblastom-Zellen und einer günstigen Prognose einher (Morandi et al., 2012; Hansford et al., 2007; Schulte et al., 2009). Lediglich im Hinblick auf die Expression des Antigens CD246 stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mit der Referenzliteratur überein. Obwohl es sich bei CD246 um ein Antigen handelt, das von über 90 % der Neuroblastome exprimiert wird, konnte in dieser Arbeit auf keiner der untersuchten Zelllinien eine relevante Expression nachgewiesen werden (Lamant et al., 2000; Carpenter et al., 2012; Walker et al., 2017). Diese Unstimmigkeit könnte durch die unterschiedliche Spezifität der durchflusszytometrisch verwendeten mAK oder deren Bindung an verschiedene Epitope des Antigens CD246 erklärt werden und sollte in Folgearbeiten weiterführend untersucht werden. Für die weitere Durchführung dieser Arbeit war die fehlende Expression von CD246 allerdings nicht relevant, da andere Antigene auf den Zielzelllinien als Zielstrukturen für die AdCAR-NK-92-Zellen gewählt werden konnten.

4.1.3 Zytotoxizität von Adapter-CAR-NK-92-Zellen am Beispiel des Neuroblastoms

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Untersuchung der Neuroblastom-Zelllinien wurden die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen mithilfe von Calcein-Release-Tests validiert. Dafür wurden die zuvor untersuchten Neuroblastom-Zelllinien gemeinsam mit bAK gegen Antigene eingesetzt, deren Expression zuvor bestätigt wurde.

Insgesamt wurde bei Einsatz der AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit bAK eine relevante AdCAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber allen Neuroblastom-Zelllinien beobachtet und die Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen bestätigt. In Übereinstimmung mit der Beobachtung von *Grote et al.*, dass die AdCAR-vermittelte Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen durch Titration der bAK kontrolliert werden kann, war die AdCAR-vermittelte Zytotoxizität mit bAK auch

in dieser Arbeit signifikant höher als die AdCAR-unabhängige, intrinsische Zytotoxizität ohne bAK (Grote et al., 2020b). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Höhe der AdCAR-vermittelten Zytotoxizität positiv mit der Antigendichte auf der jeweiligen Zielzelllinie korreliert. Dabei weist der berechnete Korrelationskoeffizient von 0,76 gemäß der Einteilung von *Cohen* auf einen starken Effekt dieses Zusammenhangs hin (Cohen, 1992)

Im Hinblick auf die Immuntherapie des Neuroblastoms ist vor allem die hohe Antigendichte von CD146 und CD171 auf Neuroblastom-Zelllinien und daraus folgend die hohe AdCAR-vermittelte Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen bei Verwendung von bAK gegen CD146 und CD171 relevant. Da CD146 und CD171 bereits präklinisch bzw. klinisch im Rahmen Antikörper-basierter bzw. CAR-T-Zell-basierter Immuntherapie als Zielstrukturen zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzt wurden, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit deren Stellenwert als Zielstrukturen zur Therapie des Neuroblastoms (Obu et al., 2019; Künkele et al., 2017; Park et al., 2007).

4.2 Einfluss von TGF β auf die Zytotoxizität von Adapter-CAR NK-92 Zellen und therapeutische Blockade mit Galunisertib

Immunsuppressive Zytokine wie TGF β stellen eine Herausforderung der CAR-basierten Immuntherapie solider Tumore dar und spielen auch im Tumormikromilieu des Neuroblastoms eine Rolle (Tran et al., 2017; Yilmaz et al., 2020). Da TGF β im Hinblick auf zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen zu verminderter Expression von aktivierenden Rezeptoren, gehemmter Proliferation und eingeschränkter Zytotoxizität führt, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von TGF β auf die Viabilität, das Rezeptorprofil und die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen untersucht (Wilson et al., 2011; Thomas and Massagué, 2005). Dafür wurden TGF β -Konzentrationen zwischen 5 ng/ml und 50 ng/ml eingesetzt, die an den Plasma-Konzentrationen von Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien orientiert sind und auch in der Referenzliteratur verwendet wurden (Narai et al., 2002; Akiyama et al., 2005; Otegbeye et al., 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nicht von einer Inkubation mit TGF β beeinflusst wurde und stimmen mit den Ergebnissen von *Lee et al.* und *Wang et al.* überein, die bei Inkubation von NK-92-Zellen mit TGF β in Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml ebenfalls weder eine Verminderung von Viabilität oder Proliferation noch eine Vermehrung der Apoptose feststellen konnten (Lee et al., 2014; Wang et al., 2017). Allerdings wurde im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit TGF β eine Herunterregulation des Oberflächenantigens CD25 (IL2R α) beobachtet, das als Indikator für proliferatives Potential von NK-Zellen gilt (Clausen, 2003). Da weder in der Literatur noch in dieser Arbeit eine Einschränkung der AdCAR-NK-92-Zellen festgestellt werden konnte, sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob sich die Herunterregulation von CD25 auf Viabilität und Proliferation auswirkt (Lee et al., 2014; Wang et al., 2017). Im Hinblick auf den klinischen Einsatz von AdCAR-NK-92-Zellen wäre eine TGF β -induzierte Einschränkung der Proliferation ohnehin nicht relevant, da AdCAR-NK-92-Zellen *in vitro* expandiert und vor Infusion in Patienten mit 10 Gy bestrahlt werden. Infolge der Bestrahlung sistiert auch die Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen, so dass inhibitorische Auswirkungen von TGF β auf die Proliferation der AdCAR-NK-92 Zellen *in vivo* zu vernachlässigen wären.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der AdCAR-NK-92-Zellen zeigte sich außerdem, dass die Expression verschiedener aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren bei Inkubation mit TGF β vermindert war. In Übereinstimmung damit wird auch in der Literatur eine TGF β -induzierte Verminderung der Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren auf primären NK-Zellen und NK-92-Zellen beschrieben (Lee et al., 2014; Tran et al., 2017; Otegbeye et al., 2018; Wang et al., 2017). Studienübergreifend wird im Zuge der Inkubation mit TGF β vor allem die Herunterregulation des aktivierenden Rezeptors CD314 (NKG2D), die auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, mit einer Verminderung der Zytotoxizität von NK-Zellen und NK-92-Zellen in Verbindung gebracht (Tran et al., 2017; Lee et al., 2014; Castriconi et al., 2003; Sun et al., 2012; Wang et al., 2017). Zusätzlich wird in der Literatur der

Stellenwert weiterer aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wie CD226 (DNAM-1), CD337 (NKp30), CD336 (NKp44), CD335 (NKp46) und CD244 (2B4) diskutiert, deren Expression nach Inkubation mit TGF β auf NK-Zellen und NK-92-Zellen studienabhängig vermindert oder unverändert blieb und in dieser Arbeit auf AdCAR-NK-92-Zellen größtenteils vermindert war (Tran et al., 2017; Lee et al., 2014; Castriconi et al., 2003; Sun et al., 2012; Wang et al., 2017). Obwohl die Herunterregulation aktivierender Rezeptoren im Zusammenhang mit TGF β für eine reduzierte Aktivierbarkeit der AdCAR-NK-92-Zellen spricht, stellte sich die Expression des CARs, der für die AdCAR-vermittelte Zytotoxizität verantwortlich ist, trotz Inkubation mit TGF β unverändert dar.

In Übereinstimmung damit zeigte sich in der Funktionstestung, dass die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber Neuroblastom-Zelllinien im Zuge der Inkubation mit TGF β vermindert aber nicht vollständig inhibiert wurde. Aufgrund unterschiedlicher Zielzelllinien, E:Z-Verhältnisse, Antikörper, TGF β -Konzentrationen, Inkubationszeiten und im Falle primärer NK-Zellen unterschiedlicher Spender ist ein präziser Vergleich der Auswirkungen von TGF β auf die Zytotoxizität von NK-Zellen, NK-92-Zellen und AdCAR-NK-92-Zellen nur eingeschränkt möglich. In der Tendenz stimmt die verfügbare Literatur aber mit dieser Arbeit überein und zeigt, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen und NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β ebenfalls signifikant reduziert, aber nicht vollständig inhibiert wird (Tran et al., 2017; Otegbeye et al., 2018; Yang et al., 2013; Lee et al., 2014; Wilson et al., 2011). Um besser abzuschätzen, welche klinische Relevanz die TGF β -induzierte, partielle Einschränkung der Zytotoxizität hat, sollte weiterführend mit Impedanz-basierter Echtzeitüberwachung validiert werden, inwieweit sich die TGF β -induzierte Einschränkung im zeitlichen Verlauf auswirkt.

In der Literatur werden mehrere Strategien zur Blockade der TGF β -induzierten Hemmung der Funktionalität von NK-Zellen und NK-92-Zellen beschrieben. Die niedermolekulare Verbindung Galunisertib, die als TGF β -Rezeptor-1-Antagonist wirkt, wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die TGF β -induzierte Einschränkung der Zytotoxizität von NK-Zellen wiederherzustellen (Tran et al., 2017; Otegbeye et al., 2018). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die

vielversprechenden Ergebnisse mit Galunisertib auch mit AdCAR-NK-92-Zellen erzielt werden können.

Insgesamt legen die Ergebnisse der Funktionstestung nahe, dass die TGF β -induzierte Verminderung der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen durch Galunisertib annähernd bis zum Kontrollniveau wiederhergestellt werden konnte. Damit stehen diese Ergebnisse im Einklang mit denen von *Tran et al.* und *Otegbeye et al.*, die in vergleichbaren Experimenten die Zytotoxizität aktivierter NK-Zellen wiederherstellen konnten (Tran et al., 2017; Otegbeye et al., 2018).

Im Vergleich zu den Arbeiten mit NK-Zellen waren allerdings die Mittelwertunterschiede der Zytotoxizitätswerte zwischen der Kontrolle und den mit TGF β und/oder Galunisertib behandelten AdCAR-NK-92-Zellen in dieser Arbeit nur sehr gering ausgeprägt. Um eine präzisere Aussage zur Auswirkung von Galunisertib auf die Funktionalität von AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β zu treffen, sollten deswegen weiterführende Untersuchungen des Rezeptorprofils, der Zytokinsekretion und der Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen im zeitlichen Verlauf durchgeführt werden. Parallel können alternative Optionen zur Blockade der Auswirkungen von TGF β auf AdCAR-NK-92-Zellen getestet werden. In den Arbeiten von *Yang et al.* und *Wang et al.* wurde demonstriert, dass NK-92-Zellen genetisch mit einem Rezeptor modifiziert werden können, der nach Bindung von TGF β deren Aktivierung induziert oder den modifizierten Zellen Resistenz gegenüber TGF β verleiht (Yang et al., 2013; Wang et al., 2017).

4.3 Bestrahlung mit 10 Gy reduziert die Viabilität und die Zytotoxizität von Adapter-CAR NK-92 Zellen

Da NK-92-Zellen ursprünglich aus einem Non-Hodgkin-Lymphom etabliert wurden, müssen sie vor Infusion in Patienten mit der Energiedosis 10 Gy bestrahlt werden, um die Entstehung eines sekundären Lymphoms zu verhindern (Tonn et al., 2013; Zhang et al., 2017). Die Bestrahlung wird mit dem Ziel durchgeführt, die Proliferation und Viabilität der NK-92-Zellen *in vivo* zeitlich zu begrenzen und gleichzeitig die Funktionalität möglichst wenig zu beeinträchtigen (Nowakowska et al., 2018). Daran anknüpfend wurde in dieser Arbeit untersucht,

wie sich eine Bestrahlung mit 10 Gy auf die Viabilität und Zytotoxizität von AdCAR-NK-92 Zellen auswirkt.

Insgesamt wurde beobachtet, dass die Viabilität und Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung zunächst unverändert waren und erst im Verlauf der nächsten 48 h bzw. 96 h sukzessive abnahmen. Damit befinden sich die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Auswirkungen von Bestrahlung auf CAR-exprimierende NK-92-Zellen (Zhang et al., 2016; Nowakowska et al., 2018; Grote et al., 2020a; Grote et al., 2020b). Dass die zeitlich begrenzte Viabilität und Zytotoxizität bestrahlter CAR-NK-92 Zellen nicht unbedingt mit reduzierter Wirksamkeit einhergeht, wurde von *Grote et al.* demonstriert: Im Rahmen einer 60-stündigen, Impedanz-basierten Echtzeitüberwachung des Wachstums der Neuroblastom-Zelllinien Kelly, LAN-1 und LS wurde mit bestrahlten CD276-CAR-NK-92-Zellen eine vergleichbare Wachstumshemmung wie mit unbestrahlten CD276-CAR-NK-92-Zellen erzielt (Grote et al., 2020a). Da CAR-exprimierende NK-92-Zellen *in vitro* kostengünstig expandiert werden können, sind multiple Infusionen aktuell die Möglichkeit der Wahl, um die therapeutische Wirksamkeit bestrahlter CAR-NK-92-Zellen trotz reduzierter Persistenz *in vivo* zu verbessern bzw. zu verlängern (Nowakowska et al., 2018; Oelsner et al., 2019; Mitwasi et al., 2020). Die Sicherheit multipler Infusionen mit bis zu 5×10^9 CAR-NK-92-Zellen wurde von *Tang et al.* ohne Auftreten relevanter Toxizität in einer klinischen Studie an AML-Patienten demonstriert (Tang et al., 2018). Eine andere Möglichkeit zur Umgehung der mit Bestrahlung verbundenen Herausforderungen ist die Modifikation der CAR-NK-92-Zellen mit einem Suizidgen, das die Persistenz und Wirksamkeit *in vivo* verlängert und es erlaubt, die modifizierten Zellen bei Auftreten unvorhergesehener Toxizität zu eliminieren (Oelsner et al., 2019). Analog zu den Erkenntnissen von *Grote et al.* kommt auch diese Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Bestrahlung mit 10 Gy geeignet ist, um die Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen zu begrenzen, ohne ihre therapeutische Wirksamkeit mehr als notwendig zu beeinträchtigen (Grote et al., 2020b).

4.4 Pharmakologische Kontrolle der Adapter-CAR-Funktion mit Dasatinib

Insgesamt besitzen AdCAR-NK-92-Zellen bereits ein günstiges Sicherheitsprofil mit voneinander unabhängigen Kontrollmechanismen. Da AdCAR-NK-92-Zellen im Gegensatz zu CAR-T-Zellen keine messbaren Mengen IL-4 oder IL-6 produzieren, ist die Induktion eines Zytokinfreisetzungssyndroms unwahrscheinlich (Grote et al., 2020b; Zhang et al., 2017). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bietet auch die Bestrahlung mit 10 Gy zusätzliche Sicherheit, weil sich die Anzahl bestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen innerhalb weniger Tage von selbst vermindert. Schließlich besitzen die bAK im Kontext des Adapter-CAR-Systems gewissermaßen die Funktion aktivierender Moleküle, da sie obligatorisch für die Aktivierung der AdCAR-NK-92-Zelle durch den CAR sind und die Anzahl der gebildeten immunologischen Synapsen durch Titration der bAK reguliert werden kann (Fesnak et al., 2016; Grote et al., 2020b). Bemerkenswert ist außerdem, dass AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit bAK gegen CD19 und CD20 keine Zytotoxizität gegenüber vitalen B-Zellen und in Kombination mit bAK gegen CD56 auch keine Zytotoxizität gegenüber anderen AdCAR-NK-92-Zellen vermitteln (Grote et al., 2018; Grote et al., 2020b).

Eine weitere Möglichkeit, um CAR-modifizierte Immunzellen im Falle unvorhergesehener Toxizität pharmakologisch zu kontrollieren ohne sie zu eliminieren, stellt der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib dar (Mestermann et al., 2019; Wu et al., 2019). Nachdem mit Dasatinib präklinisch bereits eine dosisabhängige, reversible Hemmung der Antigen-induzierten Aktivierung, Zytotoxizität, Zytokinsekretion und Proliferation CAR-modifizierter T-Zellen ohne Beeinträchtigung der Viabilität erzielt werden konnte, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von Dasatinib auf die Viabilität, die CAR-Expression und die Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen untersucht (Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Weil in der Literatur aktuell noch keine Arbeiten zu den Auswirkungen von Dasatinib auf CAR-NK-Zellen oder CAR-NK-92 Zellen verfügbar sind, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu CAR-T-Zellen dargestellt.

Primär konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Viabilität und Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nicht von einer Inkubation mit Dasatinib

beeinflusst wurden. Im Hinblick auf die Viabilität stimmt dieses Ergebnis mit der Literatur überein, da *Weber et al.* und *Mestermann et al.* ebenfalls keine Veränderung der Viabilität CAR-modifizierter T-Zellen feststellen konnten (Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Demgegenüber steht die eingeschränkte Proliferation CAR-modifizierter T-Zellen infolge der Inkubation mit Dasatinib scheinbar im Gegensatz zur unbeeinträchtigten Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen. Allerdings ist anzumerken, dass in den Arbeiten von *Mestermann et al.* und *Weber et al.* jeweils die Proliferation CAR-modifizierter T-Zellen nach Stimulation des CARs gemessen wurde, während in dieser Arbeit die Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nach Stimulation mit IL-2 betrachtet wurde (Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit und den Ergebnissen von *Mestermann et al.* und *Weber et al.* demonstrierten *Schade et al.*, dass die T-Zell-Rezeptor-stimulierte Proliferation von T-Zellen bei Inkubation mit Dasatinib gehemmt wurde, während die IL-2-induzierte Proliferation der T-Zellen auch bei Inkubation mit Dasatinib unbeeinträchtigt blieb (Schade et al., 2008; Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse von AdCAR-NK-92-Zellen präsentierte sich die CAR-Expression selbst bei Dasatinib-Konzentrationen von bis zu 100 nM unbeeinflusst und bestätigt, dass die inhibierende Wirkung von Dasatinib nicht durch verminderte Transkription des CARs zustande kommt. Analog zu den Ergebnissen von *Mestermann et al.* und *Weber et al.* mit CAR-T-Zellen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Dasatinib in der Lage ist, die Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen vorübergehend und dosisabhängig zu inhibieren (Mestermann et al., 2019; Weber et al., 2019). Diese Eigenschaft von Dasatinib könnte klinisch gezielt zur pharmakologischen Kontrolle unvorhergesehener, CAR-induzierter Toxizität genutzt werden (Wu et al., 2019). In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse der Arbeit von *Mestermann et al.* vielversprechend: Immundefiziente Mäuse, denen ein Lymphom implantiert wurde, entwickelten infolge der Behandlung mit CD19-CAR-T-Zellen ein Zytokinfreisetzungssyndrom, dessen Mortalität durch Therapie mit Dasatinib signifikant gesenkt werden konnte (Mestermann et al., 2019). Darüber hinaus ist eine zügige Translation in die Klinik ebenfalls möglich, da Dasatinib bereits zur

Behandlung der Ph⁺ CML und Ph⁺ AML zugelassen ist (Mestermann et al., 2019). Außerdem lassen sich die Dasatinib-Konzentrationen, mit denen in dieser Arbeit die Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen vollständig inhibiert wurde, mit der Standarddosierung von 100 mg Dasatinib pro Tag ohne Weiteres in humanem Serum erreichen (Weber et al., 2019; Mestermann et al., 2019; Christopher et al., 2008).

Schlussendlich konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit erstmals demonstriert werden, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib auch zur pharmakologischen Kontrolle der CAR-Funktion von AdCAR-NK-92 Zellen-geeignet ist.

4.5 Ausblick

Anknüpfend an die Fähigkeit der AdCAR-NK-92-Zellen *in vitro* eine entsprechende Zytotoxizität gegenüber Neuroblastom-Zelllinien zu induzieren, sollten weiterführende Experimente durchgeführt werden. Analog zur Arbeit von Grote et al. könnte analysiert werden, ob die AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit bAK auch in der Lage sind, das Wachstum dreidimensionaler Neuroblastom-Sphäroide zu hemmen (Grote et al., 2020a). Anschließend käme auch die Anwendung eines xenotransplantierten Neuroblastom-Modells infrage, um das antitumorale Potenzial der AdCAR-NK-92-Zellen *in vivo* zu validieren.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse *in vitro* sollte die Zytotoxizität bestrahlter AdCAR-NK-92-Zellen und die pharmakologische Kontrolle der AdCAR-NK-92-Zellen mit Dasatinib weiterführend untersucht werden. Hier bieten sich zunächst Impedanz-basierte Messungen des Wachstums der Neuroblastom-Zelllinien und Experimente mit Neuroblastom-Sphäroiden an, bevor *in vivo* Experimente durchgeführt werden.

Im Hinblick auf das immunsuppressive Tumormikromilieu solider Tumore sind die Ergebnisse dieser Arbeit vielversprechend, da die AdCAR-NK-92-Zellen trotz Inkubation mit TGFβ nur partiell in ihrer Zytotoxizität eingeschränkt wurden. Da die Calcein-Release-Tests ihren Endpunkt nach zwei Stunden haben, bieten sich weiterführend Impedanz-basierte Messungen des Wachstums der Neuroblastom-Zelllinien an, um die Auswirkungen der TGFβ-induzierten

Einschränkung über eine längere Zeitdauer verfolgen und besser analysieren zu können.

Aufgrund der uneindeutigen Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Auswirkungen von Galunisertib auf die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β erscheint es sinnvoll, die Funktionalität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Behandlung mit TGF β und Galunisertib im Hinblick auf das Rezeptorprofil, die Zytokinsekretion und die Zytotoxizität im zeitlichen Verlauf zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Neuroblastome stellen mit einer relativen Häufigkeit von 5,5 % nach malignen hämatologischen Erkrankungen und ZNS-Tumoren die dritthäufigste Ursache maligner Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar. Da der Einschluss in die Hochrisikogruppe trotz intensiver Therapie mit einer Fünfjahresrate progressionsfreien Überlebens von kleiner als 50 % einhergeht, werden dringend neue Therapieoptionen benötigt.

Die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie ist ein standardisiertes, kostengünstiges Produkt mit vorteilhaftem Sicherheitsprofil und zuverlässiger Wirksamkeit, das nicht patientenindividuell gefertigt werden muss. In Kombination mit biotinylierten Antikörpern können AdCAR-NK-92-Zellen mehrere Tumor-assoziierte Antigene simultan oder sequentiell erkennen und einer Immunevasion des Tumors durch Herunterregulation der Zielstrukturen entgegenwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die AdCAR-NK-92-basierte Immuntherapie am Beispiel des Neuroblastoms im Hinblick auf Hürden bei der Therapie solider Tumore, die Beeinflussung ihrer Funktionalität durch Bestrahlung und die pharmakologische Kontrolle der CAR-Funktion untersucht.

Methodisch wurden die Viabilität und Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen mittels MTS-Tests und Trypanblau-Vitalfärbungen untersucht. Zur Untersuchung der Zytotoxizität von AdCAR-NK-92-Zellen gegenüber Neuroblastom-Zelllinien wurden Calcein-Release-Tests durchgeführt. Die Analyse der Expression von Oberflächenantigenen auf Neuroblastom-Zelllinien und des NK-Zell-Rezeptorprofils auf AdCAR-NK-92-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch.

Zunächst wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass AdCAR-NK-92-Zellen in Kombination mit biotinylierten Antikörpern in der Lage sind, *in vitro* entsprechende Zytotoxizität gegenüber etablierten Neuroblastom-Zelllinien zu induzieren. Aufgrund ihrer hohen Expression auf den Neuroblastom-Zelllinien erwiesen sich vor allem die Antigene CD146 (MCAM) und CD171 (L1CAM) als geeignete Zielstrukturen.

Im Hinblick auf das Tumormikromilieu solider Tumore wurde demonstriert, dass sich das immunsuppressive Zytokin TGF β nicht auf die Viabilität von AdCAR-NK-

92-Zellen auswirkt und auch ihre Zytotoxizität nur geringfügig einschränkt. Ob die TGF β -induzierte Einschränkung der Zytotoxizität durch den TGF β -Rezeptor-1-Inhibitor Galunisertib aufgehoben werden kann, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und sollte weiterführend untersucht werden.

Bestrahlung stellt als Sicherheitsmaßnahme eine Voraussetzung für die Zulassung von Immuntherapien auf Basis von NK-92-Zellen dar. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass eine Bestrahlung mit 10 Gy geeignet ist, um die Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen zu begrenzen, ohne ihre therapeutische Wirksamkeit mehr als notwendig zu beeinträchtigen.

Weiterhin wurde demonstriert, dass die Zytotoxizität der AdCAR-NK-92-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib im Sinne eines molekularen Schalters pharmakologisch kontrolliert werden kann. Da bei Einsatz von Dasatinib eine vorübergehende und dosisabhängige Inhibition der Zytotoxizität erreicht wurde, stellt der Einsatz von Dasatinib eine Möglichkeit dar, die AdCAR-NK-92-Zellen im Falle unvorhergesehener Toxizität zu kontrollieren.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass AdCAR-NK-92-Zellen einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung des Neuroblastoms und gegebenenfalls weiterer solider Tumore darstellen.

6 Literaturverzeichnis

- Agresta, L., Hoebe, K. H. N. & Janssen, E. M. 2018. The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Akiyama, T., Matsunaga, T., Terui, T., Miyanishi, K., Tanaka, I., Sato, T., Kuroda, H., Takimoto, R., Takayama, T., Kato, J., Yamauchi, N., Kogawa, K., Sakamaki, S., Hirayama, Y., Kohda, K. & Niitsu, Y. 2005. Involvement of transforming growth factor- β and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. *Leukemia*, 19, 1558-66.
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J. & Klingemann, H. 2008. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*, 10, 625-32.
- Baker, D. L., Schmidt, M. L., Cohn, S. L., Maris, J. M., London, W. B., Buxton, A., Stram, D., Castleberry, R. P., Shimada, H., Sandler, A., Shamberger, R. C., Look, A. T., Reynolds, C. P., Seeger, R. C. & Matthay, K. K. 2010. Outcome after Reduced Chemotherapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 363, 1313-23.
- Berthold, F., Spix, C., Kaatsch, P. & Lampert, F. 2017. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979–2015. *Pediatric Drugs*, 19, 577-93.
- Biedler, J. L., Helson, L. & Spengler, B. A. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33, 2643-52.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L. S. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38, 3751-7.
- Boissel, L., Betancur, M., Lu, W., Wels, W. S., Marino, T., Van Etten, R. A. & Klingemann, H. 2012. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. *Leukemia & Lymphoma*, 53, 958-65.
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castleberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M. & Hedborg, F. 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 11, 1466-77.
- Brümmendorf, T., Kenwrick, S. & Rathjen, F. G. 1998. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 87-97.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G. & Long, E. O. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107, 159-66.
- Bueno, L., De Alwis, D. P., Pitou, C., Yingling, J., Lahn, M., Glatt, S. & Trocóniz, I. F. 2008. Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF- β kinase antagonist, in mice. *European Journal of Cancer*, 44, 142-50.

- Burnet, M. 1957. Cancer--A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *BMJ*, 1, 779-86.
- Campbell, K. S. & Hasegawa, J. 2013. Natural killer cell biology: An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132, 536-44.
- Canzonetta, C., Pelosi, A., Di Matteo, S., Veneziani, I., Tumino, N., Vacca, P., Munari, E., Pezzullo, M., Theuer, C., De Vito, R., Pistoia, V., Tomao, L., Locatelli, F., Moretta, L., Caruana, I. & Azzarone, B. 2021. Identification of neuroblastoma cell lines with uncommon TAZ+/mesenchymal stromal cell phenotype with strong suppressive activity on natural killer cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9, e001313.
- Carpenter, E. L., Haglund, E. A., Mace, E. M., Deng, D., Martinez, D., Wood, A. C., Chow, A. K., Weiser, D. A., Belcastro, L. T., Winter, C., Bresler, S. C., Asgharzadeh, S., Seeger, R. C., Zhao, H., Guo, R., Christensen, J. G., Orange, J. S., Pawel, B. R., Lemmon, M. A. & Mossé, Y. P. 2012. Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene*, 31, 4859-67.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. 2003. Transforming growth factor 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4120-5.
- Chang, Z. L. & Chen, Y. Y. 2017. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in Molecular Medicine*, 23, 430-50.
- Chen, L., MCGowan, P., Ashe, S., Johnston, J., Li, Y., Hellström, I. & Hellström, K. E. 1994. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 179, 523-32.
- Cheung, N. K., Lazarus, H., Miraldi, F. D., Abramowsky, C. R., Kallick, S., Saarinen, U. M., Spitzer, T., Strandjord, S. E., Coccia, P. F. & Berger, N. A. 1987. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 5, 1430-40.
- Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M. & Macaulay, V. M. 2008. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clinical Cancer Research*, 14, 6364-70.
- Chmielewski, M., Hombach, A. A. & Abken, H. 2014. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological Reviews*, 257, 83-90.
- Christopher, L. J., Cui, D., Wu, C., Luo, R., Manning, J. A., Bonacorsi, S. J., Lago, M., Allentoff, A., Lee, F. Y. F., Mccann, B., Galbraith, S., Reitberg, D. P., He, K., Barros, A., Blackwood-Chirchir, A., Humphreys, W. G. & Iyer, R. A. 2008. Metabolism and Disposition of Dasatinib after Oral Administration to Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 1357.
- Clausen, J. 2003. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology*, 207, 85-93.
- Cohen, J. 1992. A power primer. *Psychological Bulletin*, 112, 155-9.

- Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Ichihara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V. & Matthay, K. K. 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 289-97.
- Darowski, D., Kobold, S., Jost, C. & Klein, C. 2019. Combining the best of two worlds: highly flexible chimeric antigen receptor adaptor molecules (CAR-adaptors) for the recruitment of chimeric antigen receptor T cells. *mAbs*, 11, 621-31.
- Dirks, W. G., Fähnrich, S., Lis, Y., Becker, E., Macleod, R. a. F. & Drexler, H. G. 2002. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 100, 49-56.
- Eggermont, A. M. & Sugarbaker, P. H. 1990. Immunogenicity of the tumor determines the outcome of immunotherapy with interleukin-2, ABPP, and cyclophosphamide of micro- and macrometastatic intraperitoneal tumor. *Cancer Detect Prev*, 14, 483-90.
- El-Badry, O. M., Romanus, J. A., Helman, L. J., Cooper, M. J., Rechler, M. M. & Israel, M. A. 1989. Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II. *Journal of Clinical Investigation*, 84, 829-39.
- Erdmann, F., Kaatsch, P., Grabow, D. & Spix, C. 2020. Annual Report 2019 (1980-2018). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg, University Mainz*, 56.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 720-4.
- Faure, M. & Long, E. O. 2002. KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. *The Journal of Immunology*, 168, 6208-14.
- Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. 2016. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 16, 566-81.
- Finney, H. M., Akbar, A. N. & Lawson, A. D. G. 2004. Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR ζ Chain. *The Journal of Immunology*, 172, 104-13.
- Fujiwara, Y., Nokihara, H., Yamada, Y., Yamamoto, N., Sunami, K., Utsumi, H., Asou, H., Takahashi, O., Ogasawara, K., Gueorguieva, I. & Tamura, T. 2015. Phase 1 study of galunisertib, a TGF-beta receptor I kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76, 1143-52.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.-M. B.-S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., Apte, R. N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A.,

- Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Cerundolo, V., Clayton, A., Colombo, M. P., Coussens, L., Dhodapkar, M. V., Eggermont, A. M., Fearon, D. T., Fridman, W. H., Fučíková, J., Gabrilovich, D. I., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giaccone, G., Gilboa, E., Gnjatic, S., Hoos, A., Hosmalin, A., Jäger, D., Kalinski, P., Kärre, K., Kepp, O., Kiessling, R., Kirkwood, J. M., Klein, E., Knuth, A., Lewis, C. E., Liblau, R., Lotze, M. T., Lugli, E., Mach, J.-P., Mattei, F., Mavilio, D., Melero, I., Melief, C. J., Mittendorf, E. A., Moretta, L., Odunsi, A., Okada, H., Palucka, A. K., Peter, M. E., Pienta, K. J., Porgador, A., Prendergast, G. C., Rabinovich, G. A., Restifo, N. P., Rizvi, N., Sautès-Fridman, C., Schreiber, H., Seliger, B., Shiku, H., Silva-Santos, B., Smyth, M. J., Speiser, D. E., Spisek, R., Srivastava, P. K., Talmadge, J. E., Tartour, E., Van Der Burg, S. H., Van Den Eynde, B. J., Vile, R., Wagner, H., Jeffrey, Whiteside, T. L., Wolchok, J. D., Zitvogel, L., Zou, W. & Kroemer, G. 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5, 12472-508.
- Gong, J. H., Maki, G. & Klingemann, H. G. 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8, 652-8.
- Gray, J. C. & Kohler, J. A. 2009. Immunotherapy for neuroblastoma: Turning promise into reality. 53, 931-40.
- Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 10024-8.
- Grote, S., Chan, K. C. H., Baden, C., Bösmüller, H., Sulyok, M., Frauenfeld, L., Ebinger, M., Handgretinger, R. & Schleicher, S. 2020a. CD276 as a novel CAR NK-92 therapeutic target for neuroblastoma. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY*.
- Grote, S., Mittelstaet, J., Baden, C., Chan, K. C.-H., Seitz, C., Schlegel, P., Kaiser, A., Handgretinger, R. & Schleicher, S. 2020b. Adapter chimeric antigen receptor (AdCAR)-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for universal tumor targeting. *Oncotarget*, 9, 1825177.
- Grote, S., Seitz, C. M., Diepold, S., Buchner, M., Baden, C., Malenke, E., Dieckmann, S. M., Schwaemmle, H., Mittelstaet, J., Kaiser, A., Schlegel, P., Handgretinger, R. & Schleicher, S. 2018. Adapter Chimeric Antigen Receptor (aCAR)-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Universal Tumor Targeting. *Blood*, 132, 3331-.
- Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S. D., Reisfeld, R. A. & Niethammer, D. 1995. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. 31, 261-7.
- Hansford, L. M., Mckee, A. E., Zhang, L., George, R. E., Gerstle, J. T., Thorner, P. S., Smith, K. M., Look, A. T., Yeger, H., Miller, F. D., Irwin, M. S., Thiele, C. J. & Kaplan, D. R. 2007. Neuroblastoma Cells Isolated from Bone Marrow Metastases Contain a Naturally Enriched Tumor-Initiating Cell. *Cancer Research*, 67, 11234-43.
- Heldin, C.-H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. 1997. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-71.

- Himoudi, N., Yan, M., Papanastasiou, A. & Anderson, J. 2008. MYCN as a target for cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57, 693-700.
- Hoefnagel, C. A., Rutgers, M., Buitenhuis, C. K. M., Smets, L. A., Kraker, J. D., Meli, M., Carrel, F., Amstutz, H., Schubiger, P. A. & Novak-Hofer, I. 2001. A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *European Journal of Nuclear Medicine*, 28, 359-68.
- Hu, Y., Tian, Z.-G. & Zhang, C. 2018. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39, 167-76.
- Humphries, C. 2013. Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature*, 504, S13-S5.
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B. & Yamamoto, T. 1997. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 14, 439-49.
- Jabbari, P., Hanaei, S. & Rezaei, N. 2019. State of the art in immunotherapy of neuroblastoma. *Immunotherapy*, 11, 831-50.
- Juelke, K., Killig, M., Luetke-Eversloh, M., Parente, E., Gruen, J., Morandi, B., Ferlazzo, G., Thiel, A., Schmitt-Knosalla, I. & Romagnani, C. 2010. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*, 116, 1299-307.
- Kaiser, A. M., J; Huppert, V; Miltenyi, S; Schlegel, P; Seitz, C; Lang, P; Handgretinger, R, Inventors; Miltenyi Biotec GmbH, Assignee. 2016. *Adapter chimeric antigen receptor expressing cells for targeting of multiple antigens*. EPC patent application EP3315511A1. 29.10.2016.
- Karlsson, H., Svensson, E., Gigg, C., Jarvius, M., Olsson-Strömberg, U., Savoldo, B., Dotti, G. & Loskog, A. 2015. Evaluation of Intracellular Signaling Downstream Chimeric Antigen Receptors. *PLOS ONE*, 10, e0144787.
- Kholodenko, I. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Deyev, S. M. & Kholodenko, R. V. 2018. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-25.
- Kim, S. Y., Toretsky, J. A., Scher, D. & Helman, L. J. 2009. The Role of IGF-1R in Pediatric Malignancies. *The Oncologist*, 14, 83-91.
- Klingemann, H., Boissel, L. & Toneguzzo, F. 2016. Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Klingemann, H. G. & Martinson, J. 2004. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*, 6, 15-22.
- Klingemann, H. G., Wong, E. & Maki, G. 1996. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2, 68-75.
- Kolb, E. A., Gorlick, R., Houghton, P. J., Morton, C. L., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C. P., Maris, J. M., Keir, S. T., Billups, C. A. & Smith, M. A. 2008. Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the

- IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric Blood & Cancer*, 50, 1190-7.
- Künkele, A., Taraseviciute, A., Finn, L. S., Johnson, A. J., Berger, C., Finney, O., Chang, C. A., Rolczynski, L. S., Brown, C., Mgebroff, S., Berger, M., Park, J. R. & Jensen, M. C. 2017. Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility. *Clinical Cancer Research*, 23, 466-77.
- Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S. W., Mason, D. Y., Delsol, G. & Mariamé, B. 2000. Expression of the ALK Tyrosine Kinase Gene in Neuroblastoma. *The American Journal of Pathology*, 156, 1711-21.
- Lanier, L. L. 2004. NK CELL RECOGNITION. *Annual Review of Immunology*, 23, 225-74.
- Lee, H. M., Kim, K.-S. & Kim, J. 2014. A comparative study of the effects of inhibitory cytokines on human natural killer cells and the mechanistic features of transforming growth factor-beta. *Cellular Immunology*, 290, 52-61.
- Leroith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. & Roberts, A. T. 1995. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocrine Reviews*, 16, 143-63.
- Letterio, J. J. 2000. Murine models define the role of TGF- β as a master regulator of immune cell function. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11, 81-7.
- Li, X. & Chen, W. 2019. Mechanisms of failure of chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Current Opinion in Hematology*, 26.
- Lohmueller, J. J., Ham, J. D., Kvorjak, M. & Finn, O. J. 2018. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncolmmunology*, 7, e1368604.
- Maki, G., Klingemann, H. G., Martinson, J. A. & Tam, Y. K. 2001. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*, 10, 369-83.
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. 2007. Neuroblastoma. *The Lancet*, 369, 2106-20.
- Massagué, J. 2008. TGF β in Cancer. *Cell*, 134, 215-30.
- Mehta, R. S. & Rezvani, K. 2018. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Mestermann, K., Giavridis, T., Weber, J., Rydzek, J., Frenz, S., Nerreter, T., Mades, A., Sadelain, M., Einsele, H. & Hudecek, M. 2019. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Science Translational Medicine*, 11, eaau5907.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25.
- Mitwasi, N., Feldmann, A., Arndt, C., Koristka, S., Berndt, N., Jureczek, J., Loureiro, L. R., Bergmann, R., Máthé, D., Hegedüs, N., Kovács, T., Zhang, C., Oberoi, P., Jäger, E., Seliger, B., Rössig, C., Temme, A., Eitler, J., Tonn, T., Schmitz, M., Hassel, J. C., Jäger, D., Wels, W. S. & Bachmann, M. 2020. "UniCAR"-modified off-the-shelf NK-92 cells for targeting of GD2-expressing tumour cells. *Scientific Reports*, 10.

- Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G., Von Schweinitz, D., Simon, T., Cohn, S. L. & Pearson, A. D. J. 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 298-303.
- Morandi, F., Frassoni, F., Ponzoni, M. & Brignole, C. 2018. Novel Immunotherapeutic Approaches for Neuroblastoma and Malignant Melanoma. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-12.
- Morandi, F., Scaruffi, P., Gallo, F., Stigliani, S., Moretti, S., Bonassi, S., Gambini, C., Mazzocco, K., Fardin, P., Haupt, R., Arcamone, G., Pistoia, V., Tonini, G. P. & Corrias, M. V. 2012. Bone Marrow-Infiltrating Human Neuroblastoma Cells Express High Levels of Calprotectin and HLA-G Proteins. *PLoS ONE*, 7, e29922.
- Morvan, M. G. & Lanier, L. L. 2016. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16, 7-19.
- Narai, S., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Endo, T., Kubota, T. & Kitajima, M. 2002. Significance of transforming growth factor β 1 as a new tumor marker for colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 97, 508-11.
- Nazha, B., Inal, C. & Owonikoko, T. K. 2020. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E. & De Gramont, A. 2015. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 147, 22-31.
- Nowakowska, P., Romanski, A., Miller, N., Odendahl, M., Bonig, H., Zhang, C., Seifried, E., Wels, W. S. & Tonn, T. 2018. Clinical grade manufacturing of genetically modified, CAR-expressing NK-92 cells for the treatment of ErbB2-positive malignancies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67, 25-38.
- Obu, S., Umeda, K., Sonoda, M., Kato, I., Hiramatsu, H., Morita, K., Kamikubo, Y., Ogawa, E., Okamoto, S., Okajima, H., Nakahata, T., Yagyu, S., Iehara, T., Hosoi, H. & Adachi, S. 2019. CD146 is a Potential Therapeutic Target in Neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 66.
- Oelsner, S., Waldmann, A., Billmeier, A., Röder, J., Lindner, A., Ullrich, E., Marschalek, R., Dotti, G., Jung, G., Große-Hovest, L., Oberoi, P., Bader, P. & Wels, W. S. 2019. Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *International Journal of Cancer*.
- Øra, I. & Eggert, A. 2011. Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: Impact on future clinical and basic research. *Seminars in Cancer Biology*, 21, 217-28.
- Orentas, R. J., Yang, J. J., Wen, X., Wei, J. S., Mackall, C. L. & Khan, J. 2012. Identification of Cell Surface Proteins as Potential Immunotherapy Targets in 12 Pediatric Cancers. *Frontiers in Oncology*, 2.
- Otegbeye, F., Ojo, E., Moreton, S., Mackowski, N., Lee, D. A., De Lima, M. & Wald, D. N. 2018. Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of

- highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. *PLOS ONE*, 13, e0191358.
- Pardoll, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252-64.
- Park, H., Huang, X., Greene, J., Pao, J., Mulvey, E., Zhou, S. X., Sachdev, D., Yee, D., Rader, C., Albert, C. M., Hamby, C., Loeb, D., Cairo, M. S. & Zhou, X. 2015. IGF1R- and ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Immunotherapy for Poor Risk Sarcomas. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21, S52-S3.
- Park, J. R., Digiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H. B., Bautista, C., Chang, W.-C., Ostberg, J. R. & Jensen, M. C. 2007. Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. *Molecular Therapy*, 15, 825-33.
- Pinto, N. R., Applebaum, M. A., Volchenbom, S. L., Matthay, K. K., London, W. B., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Berthold, F., Schleiermacher, G., Park, J. R., Valteau-Couanet, D., Pearson, A. D. J. & Cohn, S. L. 2015. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 3008-17.
- Rawnaq, T., Quaas, A., Zander, H., Gros, S. J., Reichelt, U., Blessmann, M., Wilczak, W., Schachner, M., Sauter, G., Izbicki, J. R. & Kaifi, J. T. 2012. L1 is Highly Expressed in Tumors of the Nervous System: A Study of Over 8000 Human Tissues. *Journal of Surgical Research*, 173, 314-9.
- Rice, J., Ottensmeier, C. H. & Stevenson, F. K. 2008. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8, 108-20.
- Rodón, J., Carducci, M., Sepulveda-Sánchez, J. M., Azaro, A., Calvo, E., Seoane, J., Braña, I., Sicart, E., Gueorguieva, I., Cleverly, A., Pillay, N. S., Desai, D., Estrem, S. T., Paz-Ares, L., Holdhoff, M., Blakeley, J., Lahn, M. M. & Baselga, J. 2015. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and biomarker evaluation of transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor, galunisertib, in phase 1 study in patients with advanced cancer. *Investigational New Drugs*, 33, 357-70.
- Rubie, H., De Bernardi, B., Gerrard, M., Canete, A., Ladenstein, R., Couturier, J., Ambros, P., Munzer, C., Pearson, A. D. J., Garaventa, A., Brock, P., Castel, V., Valteau-Couanet, D., Holmes, K., Di Cataldo, A., Brichard, B., Mosseri, V., Marquez, C., Plantaz, D., Boni, L. & Michon, J. 2011. Excellent Outcome With Reduced Treatment in Infants With Nonmetastatic and Unresectable Neuroblastoma Without MYCN Amplification: Results of the Prospective INES 99.1. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 449-55.
- Rudolph, G., Schilbach-Stuckle, K., Handgretinger, R., Kaiser, P. & Hameister, H. 1991. Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Hum Genet*, 86, 562-6.
- Ruella, M., Barrett, D. M., Kenderian, S. S., Shestova, O., Hofmann, T. J., Perazzelli, J., Klichinsky, M., Aikawa, V., Nazimuddin, F., Kozlowski, M., Scholler, J., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Morrisette, J. J. D., Christian, D. A., Hunter, C. A., Kalos, M., Porter, D. L., June, C. H., Grupp, S. A. &

- Gill, S. 2016. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *Journal of Clinical Investigation*, 126, 3814-26.
- Sawaisorn, P., Atjanasuppat, K., Anurathapan, U., Chutipongtanate, S. & Hongeng, S. 2020. Strategies to Improve Chimeric Antigen Receptor Therapies for Neuroblastoma. *Vaccines*, 8, 753.
- Sawyer, J. S., Anderson, B. D., Beight, D. W., Campbell, R. M., Jones, M. L., Herron, D. K., Lampe, J. W., Mccowan, J. R., Mcmillen, W. T., Mort, N., Parsons, S., Smith, E. C. R., Vieth, M., Weir, L. C., Yan, L., Zhang, F. & Yingling, J. M. 2003. Synthesis and Activity of New Aryl- and Heteroaryl-Substituted Pyrazole Inhibitors of the Transforming Growth Factor- β Type I Receptor Kinase Domain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 3953-6.
- Schade, A. E., Schieven, G. L., Townsend, R., Jankowska, A. M., Susulic, V., Zhang, R., Szpurka, H. & Maciejewski, J. P. 2008. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*, 111, 1366-77.
- Schönmann, S. M., Iyer, J., Laeng, H., Gerber, H. A., Käser, H. & Blaser, K. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies against human neuroblastoma. *International Journal of Cancer*, 37, 255-62.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331, 1565-70.
- Schulte, J. H., Pentek, F., Hartmann, W., Schramm, A., Friedrichs, N., Øra, I., Koster, J., Versteeg, R., Kirfel, J., Buettner, R. & Eggert, A. 2009. The low-affinity neurotrophin receptor, p75, is upregulated in ganglioneuroblastoma/ganglioneuroma and reduces tumorigenicity of neuroblastoma cells in vivo. *International Journal of Cancer*, 124, 2488-94.
- Schulz, G., Cheresch, D. A., Varki, N. M., Yu, A., Staffileno, L. K. & Reisfeld, R. A. 1984. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res*, 44, 5914-20.
- Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. & Berthold, F. 2003. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology*, 4, 472-80.
- Seeger, R. C., Rayner, S. A., Banerjee, A., Chung, H., Laug, W. E., Neustein, H. B. & Benedict, W. F. 1977. Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*, 37, 1364-71.
- Seitz, C. M., Kieble, V., Illi, C., Reiter, S., Grote, S., Mittelstaet, J., Lock, D., Kaiser, A., Schleicher, S., Handgretinger, R., Lang, P. & Schlegel, P. 2018. Combinatorial Targeting of Multiple Shared Antigens By Adapter-CAR-T Cells (aCAR-Ts) Allows Target Cell Discrimination and Specific Lysis Based on Differential Expression Profiles. *Blood*, 132, 4543-.
- Seitz, C. M., Schlegel, P., Hau, J., Krahl, A.-C., Schroeder, S., Bender, G., Reiter, S., Schleicher, S., Schilbach, K., Ebinger, M., Knopf, P., Kneilling, M., Pichler, B. J., Mittelstaet, J., Lock, D., Kaiser, A., Lang, P. J. & Handgretinger, R. 2017. Novel Adapter Chimeric Antigen Receptor (aCAR) T Cells for Temporally Controllable Targeting of Single and Multiple Tumor Antigens. *Blood*, 130, 1912-.

- Serova, M., Tijeras-Raballand, A., Santos, C. D., Albuquerque, M., Paradis, V., Neuzillet, C., Benhadji, K. A., Raymond, E., Faivre, S. & De Gramont, A. 2015. Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in vivo whole tumor tissue samples from patients. *Oncotarget*, 6, 21614-27.
- Shih, I.-M. 1999. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *The Journal of Pathology*, 189, 4-11.
- Shih, I. M., Nesbit, M., Herlyn, M. & Kurman, R. J. 1998. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol*, 11, 1098-106.
- Singleton, J. R., Randolph, A. E. & Feldman, E. L. 1996. Insulin-like growth factor I receptor prevents apoptosis and enhances neuroblastoma tumorigenesis. *Cancer Res*, 56, 4522-9.
- Smith, V. & Foster, J. 2018. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children*, 5, 114.
- Strohl, W. R. 2018. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & Cell*, 9, 86-120.
- Strother, D. R., London, W. B., Schmidt, M. L., Brodeur, G. M., Shimada, H., Thorner, P., Collins, M. H., Tagge, E., Adkins, S., Reynolds, C. P., Murray, K., Lavey, R. S., Matthay, K. K., Castleberry, R., Maris, J. M. & Cohn, S. L. 2012. Outcome After Surgery Alone or With Restricted Use of Chemotherapy for Patients With Low-Risk Neuroblastoma: Results of Children's Oncology Group Study P9641. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 1842-8.
- Suck, G., Odendahl, M., Nowakowska, P., Seidl, C., Wels, W. S., Klingemann, H. G. & Tonn, T. 2016. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65, 485-92.
- Sugimoto, T., Tatsumi, E., Kemshead, J. T., Helson, L., Green, A. A. & Minowada, J. 1984. Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst*, 73, 51-7.
- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z. & Wei, H. 2012. TGF- β 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLoS Pathogens*, 8, e1002594.
- Sun, S., Hao, H., Yang, G., Zhang, Y. & Fu, Y. 2018. Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-10.
- Svennerholm, L., Boström, K., Fredman, P., Jungbjer, B., Lekman, A., Månsson, J.-E. & Rynmark, B.-M. 1994. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1214, 115-23.
- Tam, Y. K., Martinson, J. A., Doligosa, K. & Klingemann, H. G. 2003. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy*, 5, 259-72.

- Tam, Y. K., Miyagawa, B., Ho, V. C. & Klingemann, H.-G. 1999. Immunotherapy of Malignant Melanoma in a SCID Mouse Model Using the Highly Cytotoxic Natural Killer Cell Line NK-92. *Journal of Hematotherapy*, 8, 281-90.
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A. P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D. & Yu, J. 2018. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*, 8, 1083-9.
- Thomas, D. A. & Massagué, J. 2005. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8, 369-80.
- Tolbert, V. P. & Matthay, K. K. 2018. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell and Tissue Research*, 372, 195-209.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O. G. & Bug, G. 2013. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, 15, 1563-70.
- Tran, H. C., Wan, Z., Sheard, M. A., Sun, J., Jackson, J. R., Malvar, J., Xu, Y., Wang, L., Sposto, R., Kim, E. S., Asgharzadeh, S. & Seeger, R. C. 2017. TGF β R1 Blockade with Galunisertib (LY2157299) Enhances Anti-Neuroblastoma Activity of the Anti-GD2 Antibody Dinutuximab (ch14.18) with Natural Killer Cells. *Clinical Cancer Research*, 23, 804-13.
- Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J. & Greene, A. E. 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res*, 30, 2110-8.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S. & Chen, E. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO Journal*, 5, 2503-12.
- Underwood, C. K. & Coulson, E. J. 2008. The p75 neurotrophin receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 1664-8.
- Urbanska, K. & Powell, D. J. 2012. Development of a novel universal immune receptor for antigen targeting. *Oncol Immunology*, 1, 777-9.
- Valteau-Couanet, D., Le Deley, M.-C., Bergeron, C., Ducassou, S., Michon, J., Rubie, H., Le Teuff, G., Coze, C., Plantaz, D., Sirvent, N., Bouzy, J., Chastagner, P. & Hartmann, O. 2014. Long-term results of the combination of the N7 induction chemotherapy and the busulfan-melphalan high dose chemotherapy. 61, 977-81.
- Vanichapol, T., Chutipongtanate, S., Anurathapan, U. & Hongeng, S. 2018. Immune Escape Mechanisms and Future Prospects for Immunotherapy in Neuroblastoma. *BioMed Research International*, 2018, 1-11.
- Vidal, A. & Redmer, T. 2020. Decoding the Role of CD271 in Melanoma. *Cancers*, 12, 2460.
- Vitale, C. & Strati, P. 2020. CAR T-Cell Therapy for B-Cell non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Trials and Real-World Experiences. *Frontiers in Oncology*, 10.

- Vo, K. T., Matthay, K. K., Neuhaus, J., London, W. B., Hero, B., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Miniati, D., Wheeler, K., Pearson, A. D. J., Cohn, S. L. & Dubois, S. G. 2014. Clinical, Biologic, and Prognostic Differences on the Basis of Primary Tumor Site in Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 3169-76.
- Walker, A. J., Majzner, R. G., Zhang, L., Wanhainen, K., Long, A. H., Nguyen, S. M., Lopomo, P., Vigny, M., Fry, T. J., Orentas, R. J. & Mackall, C. L. 2017. Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase. *Molecular Therapy*, 25, 2189-201.
- Wang, Z., Guo, L., Song, Y., Zhang, Y., Lin, D., Hu, B., Mei, Y., Sandikin, D. & Liu, H. 2017. Augmented anti-tumor activity of NK-92 cells expressing chimeric receptors of TGF- β R II and NKG2D. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66, 537-48.
- Web-ExPasy. 2012. *Cellosaurus Kelly (CVCL_2092)* [Online]. Available: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_2092 [Accessed 22.11.2020 2020].
- Weber, E. W., Lynn, R. C., Sotillo, E., Lattin, J., Xu, P. & Mackall, C. L. 2019. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Advances*, 3, 711-7.
- Weiner, L. M. 2007. Building better magic bullets — improving unconjugated monoclonal antibody therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7, 701-6.
- Wilson, E. B., El-Jawhari, J. J., Neilson, A. L., Hall, G. D., Melcher, A. A., Meade, J. L. & Cook, G. P. 2011. Human Tumour Immune Evasion via TGF- β Blocks NK Cell Activation but Not Survival Allowing Therapeutic Restoration of Anti-Tumour Activity. *PLoS ONE*, 6, e22842.
- Wu, B. X., Song, N.-J., Riesenber, B. P. & Li, Z. 2019. Development of molecular and pharmacological switches for chimeric antigen receptor T cells. *Experimental Hematology & Oncology*, 8.
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H. G., Dennig, D., Childs, B. H., Mcguirk, J. & Reilly, R. J. 1998. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clinical Cancer Research*, 4, 2859.
- Yang, B., Liu, H., Shi, W., Wang, Z., Sun, S., Zhang, G., Hu, Y., Liu, T. & Jiao, S. 2013. Blocking transforming growth factor- β signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy. *International Immunopharmacology*, 17, 198-204.
- Yang, L. & Moses, H. L. 2008. Transforming Growth Factor β : Tumor Suppressor or Promoter? Are Host Immune Cells the Answer? *Cancer Research*, 68, 9107-11.
- Yilmaz, A., Cui, H., Caligiuri, M. A. & Yu, J. 2020. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13.
- Yousefi, H., Yuan, J., Keshavarz-Fathi, M., Murphy, J. F. & Rezaei, N. 2017. Immunotherapy of cancers comes of age. *Expert Review of Clinical Immunology*, 13, 1001-15.

- Yu, A. L., Gilman, A. L., Ozkaynak, M. F., London, W. B., Kreissman, S. G., Chen, H. X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J. G., Matthay, K. K., Shimada, H., Grupp, S. A., Seeger, R., Reynolds, C. P., Buxton, A., Reisfeld, R. A., Gillies, S. D., Cohn, S. L., Maris, J. M. & Sondel, P. M. 2010. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 363, 1324-34.
- Yu, A. L., Uttenreuther-Fischer, M. M., Huang, C. S., Tsui, C. C., Gillies, S. D., Reisfeld, R. A. & Kung, F. H. 1998. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 16, 2169-80.
- Yu, S., Li, A., Liu, Q., Li, T., Yuan, X., Han, X. & Wu, K. 2017. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*, 10.
- Zhang, C., Burger, M. C., Jennewein, L., Genßler, S., Schönfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Tonn, T., Steinbach, J. P. & Wels, W. S. 2016. ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108.
- Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T. & Wels, W. S. 2017. Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Zhang, J., Zheng, H. & Diao, Y. 2019. Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 317.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen in Abteilung I für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie unter der Betreuung von Prof. Dr.med. Rupert Handgretinger angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch meine Betreuerin Dr. rer. nat. Sabine Schleicher.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Sabine Schleicher, Caroline Baden, MTA, und M. Sc. Stefan Grote von mir eigenständig durchgeführt. Eine Ausnahme bilden die Calcein-Release-Tests mit TGF β und den Zielzelllinien Kelly und LAN-1 unter 3.2.3, die von Caroline Baden, MTA, durchgeführt wurden.

Nach Inanspruchnahme einer statistischen Beratung durch Dr. biol. hum. Corinna Engel des *Center for Pediatric Clinical Studies (CPCS)* der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen wurde die statistische Auswertung der erhobenen Daten von mir selbstständig durchgeführt.

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

Tübingen, den 29.03.2021

Gustav Bela Jung

8 Anhang

8.1 Tabellen der Calcein-Release-Tests

Tabelle 18: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen verschiedene mit Calcein-AM markierte Neuroblastom-Zelllinien nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzellverhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwert ± SDvM, n ≥ 3).

	E:Z	Zielzelllinie									
		Kelly		LAN-1		LS		SH-SY5Y		SK-N-AS	
		M	SDvM	M	SDvM	M	SDvM	M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	5,99%	2,22%	12,47%	3,43%	30,52%	6,22%	6,33%	5,11%	5,87%	3,44%
	5:1	7,34%	3,38%	10,04%	4,28%	21,59%	5,30%	4,70%	3,07%	5,32%	3,14%
	2,5:1	5,74%	3,76%	6,30%	2,17%	15,14%	3,43%	6,02%	5,49%	2,23%	1,59%
AdCAR-NK-92 mit bCD146 Zytotoxizität	10:1	52,93%	3,86%	61,47%	7,30%	64,97%	3,07%	38,43%	5,74%	53,97%	9,82%
	5:1	42,47%	6,20%	48,49%	7,71%	52,72%	2,13%	25,47%	4,23%	41,72%	8,71%
	2,5:1	36,26%	4,84%	36,20%	4,84%	44,17%	3,26%	14,18%	6,12%	32,98%	9,88%
AdCAR-NK-92 mit bCD171 Zytotoxizität	10:1	47,26%	5,18%	45,56%	5,64%	-	-	25,78%	3,57%	21,61%	7,30%
	5:1	37,52%	6,99%	33,01%	4,70%	-	-	14,33%	2,89%	17,86%	5,60%
	2,5:1	34,01%	7,15%	24,25%	3,66%	-	-	9,02%	2,94%	14,79%	6,60%
AdCAR-NK-92 mit bCD221 Zytotoxizität	10:1	-	-	28,07%	4,61%	37,15%	5,23%	16,13%	6,53%	-	-
	5:1	-	-	17,74%	4,24%	27,28%	3,91%	9,70%	5,23%	-	-
	2,5:1	-	-	12,38%	3,14%	20,50%	3,71%	5,60%	3,45%	-	-
AdCAR-NK-92 mit bCD271 Zytotoxizität	10:1	21,59%	3,72%	50,43%	7,52%	64,23%	4,08%	15,08%	4,55%	3,80%	2,93%
	5:1	17,13%	3,85%	36,36%	7,47%	56,13%	6,20%	9,09%	1,94%	3,33%	2,41%
	2,5:1	17,36%	4,25%	28,45%	5,35%	49,21%	4,49%	5,44%	2,87%	2,48%	2,68%

Tabelle 19: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TGFβ.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly- und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 48 h mit 10 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	Kelly		LAN-1	
		M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	9,13%	5,19%	8,21%	3,97%
	5:1	6,47%	6,73%	3,78%	4,00%
	2,5:1	5,67%	4,14%	2,68%	3,31%
AdCAR-NK-92 mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	68,73%	7,36%	77,95%	6,01%
	5:1	59,43%	2,48%	65,47%	8,34%
	2,5:1	44,21%	4,33%	50,02%	11,02%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	60,40%	4,01%	70,36%	7,74%
	5:1	51,52%	6,24%	59,58%	9,31%
	2,5:1	37,74%	4,23%	42,89%	7,05%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	49,91%	5,30%	72,94%	7,92%
	5:1	40,35%	2,32%	57,37%	7,71%
	2,5:1	30,51%	4,44%	43,96%	4,85%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 10 ng/ml) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	5,75%	5,70%	3,57%	5,13%
	5:1	2,47%	3,69%	2,25%	3,38%
	2,5:1	2,04%	3,51%	1,10%	1,15%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 10 ng/ml) mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	52,03%	5,35%	67,17%	5,54%
	5:1	45,89%	3,61%	62,09%	5,39%
	2,5:1	35,88%	5,12%	48,57%	5,33%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 10 ng/ml) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	41,98%	7,73%	58,87%	5,15%
	5:1	39,48%	6,91%	54,08%	6,07%
	2,5:1	30,21%	5,24%	36,70%	5,48%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 10 ng/ml) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	39,47%	7,10%	66,76%	5,05%
	5:1	37,08%	4,68%	58,43%	4,23%
	2,5:1	29,23%	5,45%	43,72%	8,39%

Tabelle 20: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit 10 ng/ml TGFβ.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 96 h mit 10 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	Kelly		LAN-1	
		M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	23,01%	7,89%	4,02%	2,75%
	5:1	16,97%	6,43%	0,64%	1,26%
	2,5:1	14,52%	8,87%	0,49%	0,95%
AdCAR-NK-92 mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	70,67%	6,61%	68,00%	6,87%
	5:1	57,03%	14,89%	50,55%	5,44%
	2,5:1	51,93%	9,15%	38,26%	7,09%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	67,33%	9,28%	63,75%	6,10%
	5:1	51,07%	8,36%	46,58%	5,46%
	2,5:1	43,91%	4,45%	30,89%	6,93%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	58,13%	4,69%	61,12%	8,00%
	5:1	44,72%	7,38%	45,39%	7,02%
	2,5:1	37,56%	4,55%	34,51%	7,07%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 10 ng/ml) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	17,39%	9,81%	1,77%	2,20%
	5:1	11,15%	8,39%	0,33%	0,59%
	2,5:1	8,66%	7,64%	0,08%	0,26%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 10 ng/ml) mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	50,98%	6,58%	50,10%	9,45%
	5:1	44,42%	6,47%	43,19%	8,28%
	2,5:1	39,72%	4,64%	32,85%	8,59%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 10 ng/ml) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	53,50%	6,32%	56,43%	4,11%
	5:1	46,68%	6,83%	47,16%	5,93%
	2,5:1	37,59%	7,42%	34,09%	3,78%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 10 ng/ml) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	49,25%	6,64%	54,33%	9,57%
	5:1	49,08%	5,90%	52,80%	6,34%
	2,5:1	43,05%	10,38%	43,15%	4,97%

Tabelle 21: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 48 h Inkubation mit 50 ng/ml TGFβ.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly- und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 48 h mit 50 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	Kelly		LAN-1	
		M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	4,79%	4,68%	8,07%	3,68%
	5:1	2,17%	3,38%	3,33%	2,16%
	2,5:1	1,19%	2,00%	2,49%	2,42%
AdCAR-NK-92 mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	66,70%	9,47%	72,07%	6,08%
	5:1	54,86%	9,26%	59,37%	7,83%
	2,5:1	46,96%	6,48%	47,91%	9,11%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	57,11%	9,39%	66,12%	8,22%
	5:1	47,74%	8,56%	52,84%	8,07%
	2,5:1	34,92%	7,87%	41,18%	7,79%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	45,73%	11,87%	65,78%	8,36%
	5:1	36,09%	10,44%	51,27%	8,34%
	2,5:1	31,48%	9,43%	41,29%	8,84%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 50 ng/ml) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	1,37%	1,85%	4,16%	4,47%
	5:1	0,41%	0,98%	1,08%	1,16%
	2,5:1	0,00%	0,00%	1,65%	4,76%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 50 ng/ml) mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	46,80%	9,57%	63,01%	6,79%
	5:1	39,24%	6,19%	53,93%	4,39%
	2,5:1	30,42%	7,63%	44,50%	5,53%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 50 ng/ml) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	38,40%	7,69%	61,23%	7,99%
	5:1	39,12%	9,24%	54,26%	5,74%
	2,5:1	28,63%	4,86%	44,82%	5,75%
AdCAR-NK-92 TGFβ (48 h, 50 ng/ml) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	37,37%	10,01%	61,87%	5,43%
	5:1	30,75%	9,39%	54,13%	5,11%
	2,5:1	25,62%	9,76%	47,07%	8,43%

Tabelle 22: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach 96 h Inkubation mit 50 ng/ml TGFβ.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte Kelly- und LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 96 h mit 50 ng/ml TGFβ inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	Kelly		LAN-1	
		M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	5,50%	3,92%	6,87%	3,81%
	5:1	0,39%	0,58%	0,72%	0,73%
	2,5:1	0,04%	0,11%	0,38%	0,96%
AdCAR-NK-92 mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	64,59%	6,40%	79,51%	5,20%
	5:1	55,04%	3,75%	69,30%	4,19%
	2,5:1	48,27%	4,48%	62,15%	4,80%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	56,14%	11,66%	77,68%	5,76%
	5:1	46,88%	11,67%	69,50%	4,86%
	2,5:1	40,20%	10,39%	62,00%	3,74%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	48,55%	11,68%	73,31%	6,54%
	5:1	40,14%	11,71%	60,68%	4,44%
	2,5:1	33,35%	9,47%	52,42%	4,15%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 50 ng/ml) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	2,21%	2,96%	4,47%	3,57%
	5:1	0,00%	0,00%	0,17%	0,29%
	2,5:1	0,00%	0,00%	0,27%	0,80%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 50 ng/ml) mit bCD200 Zytotoxizität	10:1	51,52%	7,52%	73,09%	7,16%
	5:1	44,71%	6,08%	65,33%	4,67%
	2,5:1	39,42%	4,93%	60,81%	6,69%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 50 ng/ml) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	54,18%	4,58%	79,62%	6,65%
	5:1	51,11%	3,14%	74,91%	4,95%
	2,5:1	43,17%	4,02%	64,07%	5,39%
AdCAR-NK-92 TGFβ (96 h, 50 ng/ml) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	29,43%	4,05%	67,36%	6,46%
	5:1	30,69%	4,29%	63,26%	4,82%
	2,5:1	31,13%	5,31%	62,27%	5,00%

Tabelle 23: Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGF β und Galunisertib.

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1- und LS-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 μ g/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 48 h mit 10 ng/ml TGF β alleine (T (10 ng/ml, 48 h)) oder in Kombination mit 5 μ M Galunisertib für 48 h (T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μ M, 48 h)) oder 24 h (T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μ M, 24 h)) inkubiert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte \pm SDvM, n \geq 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	LAN-1		LS	
		M	SDvM	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	2,67%	2,36%	6,33%	3,65%
	5:1	0,17%	0,43%	1,80%	1,50%
	2,5:1	0,14%	0,43%	0,38%	0,62%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	66,30%	5,77%	58,54%	3,94%
	5:1	59,66%	4,91%	56,32%	5,55%
	2,5:1	52,06%	5,21%	48,55%	4,76%
AdCAR-NK-92 mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	47,74%	6,05%	17,59%	3,86%
	5:1	39,98%	6,32%	15,86%	6,33%
	2,5:1	38,23%	6,35%	14,07%	2,88%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	1,33%	1,29%	0,91%	1,64%
	5:1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,11%	0,38%	1,85%	5,55%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	61,81%	9,13%	46,78%	8,15%
	5:1	50,89%	7,54%	40,27%	9,00%
	2,5:1	42,46%	10,14%	32,79%	7,07%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	35,55%	9,79%	6,02%	3,97%
	5:1	29,69%	8,83%	5,45%	3,50%
	2,5:1	25,69%	8,76%	7,43%	2,63%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48h) & G (5 μM, 48 h) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,31%	0,64%	1,63%	2,57%
	5:1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μM, 48 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	60,66%	8,34%	53,37%	6,92%
	5:1	47,88%	6,62%	44,64%	6,23%
	2,5:1	36,46%	8,17%	34,50%	5,69%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μM, 48 h) mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	40,53%	7,81%	11,89%	3,46%
	5:1	31,06%	7,38%	8,45%	9,12%
	2,5:1	24,50%	7,60%	8,57%	9,80%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μM, 24 h) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,66%	1,51%	1,24%	1,96%
	5:1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μM, 24 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	65,13%	4,78%	58,45%	8,51%
	5:1	54,67%	5,83%	48,67%	5,38%
	2,5:1	45,98%	9,68%	42,61%	5,15%
AdCAR-NK-92 T (10 ng/ml, 48 h) & G (5 μM, 24 h) mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	46,49%	5,82%	18,68%	3,45%
	5:1	40,98%	10,06%	13,92%	3,10%
	2,5:1	30,25%	6,49%	9,12%	2,86%

Tabelle 24: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.** AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1- und LS-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). Die Tests wurden mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy zu den angegebenen Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) durchgeführt. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n ≥ 3).

	Zielzelllinie				
	E:Z	LAN-1		LS	
		MW	SDvM	MW	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	6,34%	2,29%	18,13%	7,35%
	5:1	1,29%	1,58%	9,48%	5,60%
	2,5:1	0,57%	1,03%	3,78%	3,62%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	68,82%	7,96%	66,99%	4,89%
	5:1	63,71%	9,12%	63,13%	6,25%
	2,5:1	53,91%	9,98%	54,67%	6,20%
AdCAR-NK-92 mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	56,87%	7,77%	26,17%	7,85%
	5:1	49,10%	10,47%	20,09%	7,45%
	2,5:1	43,50%	7,78%	20,20%	6,64%
AdCAR-NK-92 10 Gy (0 h) ohne bAK	10:1	2,00%	1,41%	12,94%	8,37%
	5:1	0,03%	0,08%	6,17%	7,02%
	2,5:1	0,00%	0,00%	2,52%	3,82%
AdCAR-NK-92 10 Gy (0 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	68,88%	6,12%	68,72%	6,21%
	5:1	60,53%	4,15%	58,70%	2,93%
	2,5:1	47,88%	7,35%	50,15%	3,73%
AdCAR-NK-92 10 Gy (0 h) Zytotoxizität w/ bGD2	10:1	54,87%	4,77%	24,65%	7,01%
	5:1	45,20%	2,89%	16,46%	5,19%
	2,5:1	35,99%	4,02%	10,51%	4,48%
AdCAR-NK-92 10 Gy (24 h) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,90%	1,30%	10,58%	8,26%
	5:1	0,00%	0,00%	4,01%	3,40%
	2,5:1	0,00%	0,00%	0,29%	0,64%
AdCAR-NK-92 10 Gy (24 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	47,48%	5,15%	48,30%	9,46%
	5:1	35,49%	6,14%	35,27%	9,68%
	2,5:1	23,78%	5,85%	26,02%	7,77%
AdCAR-NK-92 10 Gy (24 h) mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	34,66%	4,49%	18,23%	8,87%
	5:1	25,01%	2,75%	11,08%	4,31%
	2,5:1	14,71%	2,64%	4,74%	3,83%
AdCAR-NK-92 10 Gy (48 h) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,33%	1,00%	2,87%	2,22%
	5:1	0,12%	0,37%	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,61%	1,53%	0,00%	0,00%
AdCAR-NK-92 10 Gy (48 h) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	15,37%	5,66%	16,56%	3,98%
	5:1	7,77%	2,02%	8,39%	4,12%
	2,5:1	3,55%	1,86%	3,27%	3,22%
AdCAR-NK-92 10 Gy (48 h) mit bGD2 Zytotoxizität	10:1	7,67%	2,62%	2,17%	2,91%
	5:1	1,32%	1,45%	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,64%	0,81%	0,00%	0,00%

Tabelle 25: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen in Gegenwart von Dasatinib.** AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). Die Tests wurden in Medium mit Dasatinib (1 nM, 10 nM, 100 nM) und ohne Dasatinib durchgeführt. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n = 3).

	Zielzelllinie		
	E:Z	LAN-1	
		M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	3,80%	2,11%
	5:1	0,63%	0,71%
	2,5:1	0,96%	1,25%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	57,14%	4,49%
	5:1	43,94%	1,85%
	2,5:1	31,49%	2,76%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	62,55%	4,48%
	5:1	50,95%	2,50%
	2,5:1	40,62%	3,91%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (1 nM) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	2,05%	2,87%
	5:1	0,94%	1,17%
	2,5:1	0,10%	0,22%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (1 nM) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	48,12%	4,54%
	5:1	42,03%	3,41%
	2,5:1	30,31%	4,26%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (1 nM) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	60,80%	4,61%
	5:1	51,46%	3,47%
	2,5:1	40,23%	2,44%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,55%	1,30%
	5:1	0,27%	0,73%
	2,5:1	0,08%	0,16%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	15,83%	3,36%
	5:1	6,52%	2,80%
	2,5:1	5,25%	1,93%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	30,63%	5,69%
	5:1	18,45%	6,47%
	2,5:1	17,67%	4,10%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	0,22%	0,66%
	5:1	0,06%	0,19%
	2,5:1	0,00%	0,00%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	0,20%	0,61%
	5:1	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,00%	0,00%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	0,08%	0,25%
	5:1	0,00%	0,00%
	2,5:1	0,00%	0,00%

Tabelle 26: **Calcein-Release-Tests mit AdCAR-NK-92-Zellen nach Vorinkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92-induzierte Zytotoxizität (spezifische Lyse) gegen mit Calcein-AM markierte LAN-1-Zellen nach 2 h Inkubation in Gegenwart von unterschiedlichen biotinylierten Antikörpern (25 µg/ml). AdCAR-NK-92-Zellen wurden vor den Tests 24 h mit Dasatinib (10 nM, 100 nM) inkubiert und anschließend weitere 24 h ohne Dasatinib kultiviert. Dargestellt sind die Daten für das Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1, 5:1 und 2,5:1 (Mittelwerte ± SDvM, n = 3).

	Zielzelllinie		
	LAN-1		
	E:Z	M	SDvM
AdCAR-NK-92 ohne bAK Zytotoxizität	10:1	6,51%	3,78%
	5:1	1,91%	1,16%
	2,5:1	0,71%	0,82%
AdCAR-NK-92 mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	69,28%	5,48%
	5:1	60,71%	6,70%
	2,5:1	56,05%	6,33%
AdCAR-NK-92 mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	63,81%	4,81%
	5:1	60,47%	5,50%
	2,5:1	58,73%	4,05%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	7,76%	2,11%
	5:1	4,00%	1,27%
	2,5:1	0,93%	1,10%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	70,71%	8,88%
	5:1	61,22%	5,67%
	2,5:1	48,85%	8,33%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	68,88%	7,23%
	5:1	56,71%	6,17%
	2,5:1	47,34%	6,61%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) ohne bAK Zytotoxizität	10:1	8,73%	2,35%
	5:1	5,74%	1,03%
	2,5:1	3,62%	4,34%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) mit bCD276 Zytotoxizität	10:1	70,83%	6,68%
	5:1	63,40%	5,12%
	2,5:1	55,03%	5,97%
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM) mit bEGFR Zytotoxizität	10:1	69,73%	6,24%
	5:1	67,05%	6,58%
	2,5:1	55,92%	7,24%

8.2 Tabellen der MTS-Tests

Tabelle 27: **Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit TGFβ oder Galunisertib.** AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit TGFβ (5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml) oder Galunisertib (1 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM) bis zum angegebenen Zeitpunkt (24 h, 48 h, 96 h) kultiviert. Das Lösungsmittel DMSO wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. Die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde durch Ermittlung der Absorption nach 2 h Inkubation mit Celltiter 96® Reagenz bestimmt und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in Prozent angegeben (Mittelwerte ± SDvM, n = 3).

	Zeit (h)	Viabilität (%)	
		M	SDvM
AdCAR-NK-92 Kontrolle	24	100,00	5,65
	48	100,00	11,27
	96	100,00	17,37
AdCAR-NK-92 DMSO	24	97,41	11,45
	48	101,10	13,68
	96	102,02	20,51
AdCAR-NK-92 TGFβ (5 ng/ml)	24	105,21	6,36
	48	106,02	15,72
	96	110,28	20,70
AdCAR-NK-92 TGFβ (10 ng/ml)	24	102,80	6,78
	48	104,71	16,50
	96	112,76	6,59
AdCAR-NK-92 TGFβ (25 ng/ml)	24	105,29	8,28
	48	102,11	21,01
	96	112,87	7,00
AdCAR-NK-92 TGFβ (50 ng/ml)	24	100,73	6,33
	48	105,84	13,66
	96	113,11	10,92
AdCAR-NK-92 Galunisertib (1 μM)	24	104,12	5,03
	48	98,35	13,73
	96	100,12	26,68
AdCAR-NK-92 Galunisertib (2,5 μM)	24	100,33	5,43
	48	104,06	15,83
	96	103,58	34,93
AdCAR-NK-92 Galunisertib (5 μM)	24	105,65	4,90
	48	105,32	11,25
	96	114,57	29,47
AdCAR-NK-92 Galunisertib (10 μM)	24	103,57	5,68
	48	110,80	7,42
	96	109,65	27,98

Tabelle 28: **Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und bis zum angegebenen Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) kultiviert. Die Viabilität von AdCAR-NK-92-Zellen wurde durch Ermittlung der Absorption nach 2 h Inkubation mit Celltiter 96® Reagenz bestimmt und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in Prozent angegeben (Mittelwerte \pm SDvM, n = 3).

	Zeit (h)	Viabilität (%)	
		M	SDvM
AdCAR-NK-92 Kontrolle	0	100,00	5,42
	24	100,00	4,87
	48	100,00	7,31
	72	100,00	8,02
	96	100,00	3,49
AdCAR-NK-92 10 Gy	0	96,24	4,83
	24	61,13	7,59
	48	27,99	9,31
	72	10,05	4,55
	96	1,29	2,29

8.3 Tabellen der Trypanblau-Vitalfärbungen

Tabelle 29: **Viabilität der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit Dasatinib (1 nM, 10 nM, 100 nM) kultiviert und in Intervallen von 24 h mit Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Das Lösungsmittel DMSO wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. Die Zellviabilität berechnet sich aus dem Anteil der lebenden AdCAR-NK-92-Zellen an der Gesamtzahl (Mittelwerte \pm SDvM, n = 3).

	Zeit (h)	Viabilität (%)	
		M	SDvM
AdCAR-NK-92 Kontrolle	24	90,67	3,36
	48	94,21	3,06
	72	96,79	2,07
	96	96,44	2,79
AdCAR-NK-92 DMSO	24	89,90	2,99
	48	96,16	3,23
	72	98,00	1,92
	96	95,78	3,04
AdCAR-NK-92 Dasatinib (1 nM)	24	89,40	3,33
	48	93,39	3,02
	72	96,77	1,90
	96	95,86	3,05
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM)	24	93,45	2,72
	48	95,36	2,67
	72	95,63	2,68
	96	96,01	1,61
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM)	24	91,07	2,57
	48	92,59	3,58
	72	95,50	2,48
	96	96,49	2,51

Tabelle 30: **Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen nach Inkubation mit Dasatinib.**

AdCAR-NK-92-Zellen wurden mit Dasatinib (1 nM, 10 nM, 100 nM) kultiviert und in Intervallen von 24 h mit Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Das Lösungsmittel DMSO wurde als Vehikelkontrolle eingesetzt. Die Proliferation der AdCAR-NK-92-Zellen ergibt sich aus der Anzahl an lebenden Zellen in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in Prozent (Mittelwerte \pm SDvM, n = 3).

	Zeit (h)	Proliferation (% der Kontrolle)	
		M	SDvM
AdCAR-NK-92 Kontrolle	24	100,00	15,90
	48	100,00	15,24
	72	100,00	13,36
	96	100,00	13,57
AdCAR-NK-92 DMSO	24	112,50	19,43
	48	90,30	10,49
	72	105,10	14,24
	96	91,86	14,10
AdCAR-NK-92 Dasatinib (1 nM)	24	113,64	18,31
	48	87,26	17,18
	72	114,45	15,43
	96	98,69	20,04
AdCAR-NK-92 Dasatinib (10 nM)	24	97,35	11,95
	48	104,43	19,96
	72	98,58	18,74
	96	96,33	15,61
AdCAR-NK-92 Dasatinib (100 nM)	24	114,90	19,16
	48	83,66	19,60
	72	91,41	12,76
	96	87,23	17,14

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, der diese Arbeit ermöglicht und begutachtet hat.

Hervorheben möchte ich meine Betreuerin Dr. rer. nat. Sabine Schleicher und ihr ebenfalls herzlich danken. Von der Konzeption bis zur Korrektur der Arbeit war sie immer für mich da und hat mich mit Anregungen und konstruktiver Kritik bei allen Fragestellungen unterstützt.

Für die gute Einarbeitung im Labor, die Unterstützung bei technischen Schwierigkeiten und mehr als ein offenes Ohr bei aufkommenden Fragen möchte ich mich bei Caroline Baden, Elke Malenke und insbesondere M. Sc. Stefan Grote bedanken. Von seiner ruhigen Art und Geduld habe ich sehr profitiert.

Bei Dr. biol. hum. Corinna Engel möchte ich mich für die statistische Beratung bedanken.

Für gute Gespräche und Aufmunterung bei Durststrecken bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Constantin Adams. Auch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mir in stressigen Phasen zur Seite standen, möchte ich mich bedanken. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei Gesine Brehmer für ihre emotionale Unterstützung, ihre positive Art und ihre Fähigkeit, das Beste in mir zu Tage zu bringen.

Vielen Dank an alle Genannten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre!