



GD₂-spezifische CAR-NK-Zellen für die adoptive Krebsimmuntherapie

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von Malena Bodden

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Winfried Wels

Darmstadt 2023

Bodden, Malena : GD₂-spezifische CAR-NK-Zellen für die adoptive Krebsimmuntherapie
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2023
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-236363
Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2023

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den

.....

(Unterschrift)

Zusammenfassung

Das Disialogangliosid GD₂ weist in gesundem Gewebe eine eingeschränkte Expression auf und findet sich überwiegend nur im zentralen Nervensystem, auf peripheren Nerven und mesenchymalen Stromazellen. Es ist jedoch in erhöhtem Maß in tumorösem Gewebe exprimiert und liegt primär auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wie dem Neuroblastom oder dem Melanom und in unterschiedlichem Ausmaß auch auf Sarkomen oder Brustkrebs-Stammzellen vor. GD₂ spielt eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese und seine Expression korreliert mit einer gesteigerten Tumorprogression und einer schlechteren Prognose. Der Behandlungserfolg zielgerichteter GD₂-spezifischer Therapien mit monoklonalen Antikörpern oder Immunzytokinen ist jedoch begrenzt. Obwohl einige immuntherapeutische Ansätze bei Melanom- und Neuroblastompatienten zu einem verlängerten Überleben führten, waren dennoch etwa 50 % der behandelten Patienten von einem Rezidiv betroffen. Ebenso zeigten Antikörper-basierte Behandlungsansätze keinen Effekt bei bereits fortgeschrittenen Tumoren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, NK-Zell-basierte Therapieansätze als möglichen alternativen Behandlungsansatz für GD₂-positive Tumoren zu prüfen. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems, welche in der Lage sind, gestresste und transformierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu lysieren. Neben primären NK-Zellen können in der adoptiven Immuntherapie auch immortalisierte Zelllinien wie NK-92 als *off-the-shelf*-Produkt eingesetzt werden. In klinischen Studien wurde die Sicherheit der Injektion bestrahlter NK-92-Zellen nachgewiesen. Zur Steigerung ihres therapeutischen Potenzials können diese mit einem chimären Antigenrezeptor (*Chimeric antigen receptor*, CAR), welcher ein spezifisches Tumorantigen erkennt, modifiziert werden. CARs bestehen aus einer von einem scFv (*Single chain fragment variable*)-Antikörperfragment abgeleiteten Bindedomäne, welche über eine flexible *hinge*-Region an eine Transmembrandomäne fusioniert ist, gefolgt von der intrazellulären Signaldomäne der CD3ζ-Kette. CARs der zweiten Generation enthalten eine zusätzliche ko-stimulatorische Domäne wie CD28.

Um die Aktivität von NK-92 gegen GD₂-exprimierende Tumorzellen zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit NK-92-Zellen mit einem GD₂-spezifischen CAR der zweiten Generation, welcher ein scFv-Fragment des Antikörpers hu14.18 enthält (CAR hu14.18.28.z), lentiviral transduziert. Darauf aufbauend wurde zudem ein Therapieansatz entwickelt, welcher auf CAR-NK-92-Zellen beruhte, die neben dem GD₂-spezifischen CAR den IL-15-Superagonisten RD-IL15 ektopisch exprimierten. Hierfür wurden NK-92-Zellen mit einem bicistronischen lentiviralen Vektor kodierend für den GD₂-spezifischen CAR und RD-IL15 transduziert (CAR hu14.18.28.z_RD-IL15). Durch die zusätzliche Expression des IL-15-Superagonisten sollte eine verbesserte Proliferation und antitumorale Aktivität sowohl der Produzentenzellen selbst als auch umgebender Immuneffektorzellen erreicht werden.

Zusammenfassung

Nach der lentiviralen Transduktion mit den CAR-Konstrukten wurde eine durchflusszytometrische Zellsortierung durchgeführt, um reine Zellpopulationen der CAR-exprimierenden NK-92-Zellen zu erhalten. Nach der Bestätigung der CAR-Expression erfolgte die funktionelle Charakterisierung *in vitro*. Hierbei wiesen sowohl NK-92/hu14.18.28.z- als auch NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen eine vergleichbar hohe und selektive Zytotoxizität gegenüber murinen und humanen GD₂-positiven Tumorzellen auf.

Die erfolgreiche Expression und Sekretion von RD-IL15 durch NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen und ELISA bestätigt. In Immunoblot-Analysen wurde in den Lysaten der Produzentenzellen phosphoryliertes STAT5 nachgewiesen, was die autokrine Aktivierung des IL-15-Rezeptorkomplexes durch RD-IL15 und somit die Funktionalität des IL-15-Superagonisten aufzeigte. Durch die ektopische Expression von RD-IL15 waren NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen zudem in der Lage, ohne exogenes IL-2 zu proliferieren und ihr zytotoxisches Potenzial aufrecht zu erhalten. Ein möglicher negativer Effekt der dauerhaften autokrinen RD-IL15-Stimulierung auf den Aktivierungszustand der CAR-NK-92-Zellen konnte nach durchflusszytometrischer Analyse aktivierender und inhibitorischer Marker ausgeschlossen werden. Vielmehr weisen die erhaltenen Daten darauf hin, dass der IL-15-Superagonist einem anergischen Zustand der Produzentenzellen entgegenwirkt. Die mögliche parakrine Stimulierung primärer *bystander* Zellen durch NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde in Transwell-Experimenten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Zytokin-sekretierende CAR-NK-92-Zellen in der Lage waren, die natürliche Zytotoxizität ko-kultivierter primärer Lymphozyten gegenüber der MHC I-negativen Tumorzelllinie K562 zu steigern. Ebenso erhöhte sich in gemischten Lymphozytenreaktionen durch sekretiertes RD-IL15 die Proliferation primärer NK-Zellen und CD8-positiver T-Zellen.

Als alternativer Ansatz zur Behandlung GD₂-positiver Tumoren wurde in dieser Arbeit zudem ein GD₂-spezifischer Miniantikörper (hu14.18-Fc) entwickelt. Dieser setzt sich aus dem scFv-Fragment des humanisierten, GD₂-spezifischen Antikörpers hu14.18 und einer IgG1-Fc-Domäne zusammen. Nach Bestätigung der spezifischen Bindung von hu14.18-Fc an GD₂-exprimierende Tumorzellen wurde die immunstimulatorische Wirkung des rekombinanten Moleküls auf primäre NK-Zellen in einem Zytotoxizitätsassay untersucht. Hierbei wiesen die Effektorzellen nach Zugabe des Miniantikörpers eine signifikant erhöhte Antitumoraktivität gegenüber der GD₂-positiven murinen Lymphomzelllinie EL4 auf.

In abschließenden *in vivo* Untersuchungen wurde die Antitumoraktivität der NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen sowie ein möglicher zusätzlicher Effekt des IL-15-Superagonisten in einem Neuroblastom-Xenograftmodell und einem Lymphom-Allograftmodell überprüft. Zur Etablierung des Xenograftmodells wurden UKF-NB3-Zellen intravenös in

Zusammenfassung

immundefiziente NSG-Mäuse appliziert. Die systemische Behandlung mit parentalen NK-92-Zellen und RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen führte zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums in einem Großteil der Mäuse. Jedoch zeigte die Gruppe, welche NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen erhielt, keinen Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollgruppen. Für die Etablierung des Allograftmodells erfolgte eine systemische Injektion der murinen Lymphomzelllinie EL4 in NSG-Mäuse. Hierbei führten weder eine intravenöse Injektion parentaler NK-92-Zellen noch CAR-NK-92-Zellen ohne oder mit ektopischer RD-IL15-Expression zu einer verminderten Tumorprogression oder einem Überlebensvorteil. Das Fehlen eines zusätzlichen Effekts der CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zu parentalen NK-92-Zellen im UKF-NB3-Modell könnte durch die bereits sehr ausgeprägte Sensitivität der Tumorzellen gegen die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen erklärt werden. Im Fall des EL4-Modells verhinderte das aggressive Wachstum der Tumorzellen sehr wahrscheinlich einen messbaren Effekt der modifizierten NK-92-Zellen und des sekretierten RD-IL15. Die hier erarbeiteten, vielversprechenden *in vitro* Daten lassen dennoch eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes sinnvoll erscheinen. In nachfolgenden Studien sollte dabei der Fokus auf die Etablierung verbesserter *in vivo* Modelle gelegt werden, die es dann erlauben könnten, die möglichen Effekte der CAR- und RD-IL15-Expression herauszuarbeiten. Zudem könnte untersucht werden, ob eine mögliche Steigerung der autokrinen Wirkung von RD-IL15 zu einem verbesserten therapeutischen Effekt der Zytokin-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen führen kann.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung.....	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Tumorentwicklung und Immunüberwachung	1
1.2 Natürliche Killerzellen.....	3
1.2.1 Funktion.....	3
1.2.2 Regulierung der NK-Zell-Aktivität.....	5
1.2.3 Mechanismen der NK-Zell-Zytotoxizität.....	8
1.3 NK-Zellen in der Krebsimmuntherapie.....	10
1.3.1 Zelluläre Immuntherapie mit NK-Zellen	10
1.3.2 Zytokin-basierte Krebsimmuntherapie	12
1.3.3 Genetische Modifikation mit chimären Antigenrezeptoren (CARs).....	14
1.3.4 Die NK-Zelllinie NK-92	18
1.4 Das Disialogangliosid GD₂ als Zielantigen für die Krebsimmuntherapie.....	19
1.4.1 Bedeutung von GD ₂ in der Tumorentwicklung.....	19
1.4.2 GD ₂ -überexprimierende Tumoren	21
1.4.3 Entwicklung GD ₂ -spezifischer Immuntherapien.....	22
1.5 Ziel der Arbeit	28
2 Material.....	30
2.1 Laborgeräte und Apparaturen.....	30
2.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.3 Chemikalien und Reagenzien	32
2.4 Puffer und Lösungen.....	34
2.5 Rekombinante Proteine	34
2.6 Antikörper.....	35
2.7 Plasmide	37
2.8 Oligonukleotide.....	39
2.9 Bakterienstamm.....	40
2.10 Bakterienmedien und Antibiotika	40
2.11 Zellkulturmedien und Zusätze	41
2.12 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen	42
2.13 Mausstamm	44
3 Methoden.....	45
3.1 Molekularbiologische Methoden	45

Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	45
3.1.2	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten und Dephosphorylierung linearisierter Plasmide.....	45
3.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Agarosegelen.....	46
3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
3.1.5	DNA-Ligation	46
3.1.6	Isothermaler Zusammenbau nach Gibson	47
3.1.7	Herstellung von chemokompetenten Bakterien.....	47
3.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	48
3.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	48
3.1.10	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	49
3.1.11	DNA-Sequenzierung	49
3.2	Proteinbiochemische Methoden	49
3.2.1	Herstellung von Zelllysaten	49
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	50
3.2.3	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	50
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.2.5	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung.....	52
3.2.6	Immunoblot-Analyse.....	53
3.2.7	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	54
3.3	Zellbiologische Methoden.....	55
3.3.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	55
3.3.2	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes.....	55
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl	56
3.3.4	Kryokonservierung von Zellen.....	56
3.3.5	Bestrahlung von Zellen.....	57
3.3.6	Generierung lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T-Zellen.....	57
3.3.7	Lentivirale Transduktion von Säugerzellen	58
3.3.8	Proteinproduktion in stabil transfizierten HEK293-Zellen	58
3.3.9	Durchflusszytometrische Analysen	59
3.3.10	Selektion transduzierter Säugerzellen	60
3.3.11	Proliferationsassay	60
3.3.12	Zytotoxizitätsassay	61
3.3.13	Transwell-Experimente	62
3.4	Experimente mit Mäusen.....	64
3.4.1	Haltung von Mäusen	65
3.4.2	Induktion und Behandlung GD ₂ -positiver Tumoren.....	65
3.4.3	<i>In vivo</i> Bildgebung	66

3.4.4	Organentnahme bei Mäusen	66
3.5	Statistische Analysen	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Generierung und funktionelle Charakterisierung GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen.....	69
4.1.1	Generierung eines bicistronischen lentiviralen Vektors kodierend für einen GD ₂ -spezifischen CAR und RD-IL15 zur Transduktion von NK-92-Zellen	69
4.1.2	Natürliche und GD ₂ -spezifische Zytotoxizität von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen.....	74
4.1.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2.....	82
4.2	Expressionsanalyse von RD-IL15 und funktionelle Charakterisierung Zytokin-exprimierender CAR-NK-92-Zellen	83
4.2.1	Ektopische Expression des IL-15-Superagonisten RD-IL15 in GD ₂ -spezifischen CAR-NK-92-Zellen	83
4.2.2	Autokrine Aktivierung von CAR-NK-92-Zellen durch RD-IL15	85
4.2.3	Einfluss der RD-IL15-Expression auf die Proliferation und zytotoxische Aktivität genmodifizierter NK-92-Zellen	86
4.2.4	Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 bis 4.2.3.....	94
4.3	Parakriner Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen	95
4.3.1	Zusammenfassung des Abschnitts 4.3	107
4.4	Generierung und Charakterisierung eines GD₂-spezifischen Antikörperperfusionsproteins ...	107
4.4.1	Produktion und Aufreinigung des GD ₂ -spezifischen Miniantikörpers.....	107
4.4.2	Funktionelle Charakterisierung des hu14.18-Fc Miniantikörpers.....	110
4.4.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2.....	114
4.5	Analyse der <i>in vivo</i> Antitumoraktivität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen in NSG-Mäusen	114
4.5.1	Neuroblastom-Xenograftmodell	114
4.5.2	Lymphom-Allograftmodell	120
4.5.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 und 4.5.2.....	127
5	Diskussion.....	128
5.1	Aktivität zielgerichteter NK-Zellen gegen GD₂-exprimierende Tumorzellen <i>in vitro</i>	129
5.1.1	GD ₂ -spezifische CAR-NK-92-Zellen	129
5.1.2	Kombination eines GD ₂ -spezifischen Miniantikörpers mit CD16-positiven NK-Zellen	131
5.2	Immunmodulation durch ektopische Expression von RD-IL15	132
5.2.1	IL-15 in der Krebsimmuntherapie	132
5.2.2	Eigenschaften des IL-15-Superagonisten RD-IL15.....	134
5.2.3	Umgehung unerwünschter Nebeneffekte von IL-15 durch die ektopische Expression von RD-IL15	135
5.2.4	RD-IL15-vermittelte parakrine Stimulation umgebender Immunzellen	139
5.3	Antitumoraktivität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen <i>in vivo</i>	142
5.4	Ausblick	145

Inhaltsverzeichnis

6	Literaturverzeichnis	147
7	Abkürzungsverzeichnis.....	170
	Publikationen	172
	Danksagung.....	173
	Lebenslauf	174

1 Einleitung

1.1 Tumorentwicklung und Immunüberwachung

Krebserkrankungen stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar [Statistisches Bundesamt, 2020]. Neoplasien definieren sich in erster Linie durch ungehemmtes Zellwachstum, wobei zwischen malignen (bösartigen) und benignen (gutartigen) Tumoren unterschieden wird. Letztere weisen einen nicht-invasiven Charakter auf, sind lokal begrenzt und größtenteils gut therapierbar [Weinberg, 2013]. Die Entwicklung zu Zellen mit malignem Phänotyp zeichnet sich hingegen durch hohe Invasivität und in fortgeschrittenem Stadium durch Metastasierung aus. Mögliche Risikofaktoren der Krebsentstehung stellen neben Alter und genetischer Prädisposition eine Belastung durch chemische, physikalische sowie biologische Kanzerogene dar [Ames et al., 1995]. Der Generierung neoplastischer und letzten Endes maligner Zellen gehen bestimmte tumorfördernde Faktoren (*Enabling characteristics*) voraus. Sie sind unter anderem die Folge einer Ansammlung mehrerer genetischer Veränderungen. Chromosomale Anomalien wie Translokationen oder Punktmutationen können zu einer Funktionszunahme (*Gain-of-function*) und einer gesteigerten Expression bestimmter Proto-Onkogene führen. Epigenetische Modifizierungen können die Herunterregulierung oder einen gänzlichen Funktionsverlust (*Loss-of-function*) von Tumorsuppressoren induzieren [Hanahan und Weinberg, 2000; Vogelstein und Kinzler, 2004]. Dies kann eine Anpassung der Tumorzellen und deren Infiltration in umliegendes Gewebe zur Folge haben. Weitere *Enabling characteristics*, welche die Tumorgenese beeinflussen, stellen sowohl Entzündungsprozesse innerhalb prä-maligner und maligner Läsionen, nicht-mutationsbedingte epigenetische Umprogrammierungen sowie das Mikrobiom verschiedener Gewebe dar [Hanahan, 2022]. Die erlangten Überlebensvorteile werden von Hanahan und Weinberg als spezifische Merkmale von Krebs (*Hallmarks of cancer*) zusammengefasst. Diese beinhalten die Aufrechterhaltung von Wachstumsstimulatoren, die Desensibilisierung gegenüber antiproliferativen Signalmolekülen, die Umgehung apoptotischer Prozesse, Immortalisierung, Neo-Angiogenese und die Fähigkeit des invasiven Wachstums und der Metastasierung. Diese Strategien der Tumorgenese wurden nachfolgend um vier weitere Aspekte erweitert. So sind die als „Warburg-Effekt“ bezeichnete Umstellung des Energiestoffwechsels in aerobe Glykolyse und die Immunevasion entscheidende Kriterien zur Charakterisierung von Krebs [Hanahan und Weinberg, 2011]. Des Weiteren werden sowohl die Umgehung der terminalen Differenzierung als auch die Seneszenz maligner und tumorassoziierter Zellen als *Hallmarks of cancer* beschrieben. Bei Letzterer wird als tumorfördernder Mechanismus hauptsächlich die Aktivierung des *Senescence-associated secretory phenotype* (SASP) vermutet. Dieser definiert sich durch die Sekretion bioaktiver Faktoren wie

Chemokinen und Zytokinen durch seneszente Zellen, welche die Kanzerogenese umgebender Zellen in parakriner Weise stimulieren [Hanahan, 2022].

Seit mehr als einem Jahrhundert wird der mögliche Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentwicklung diskutiert. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts vermutete Paul Ehrlich eine Art „Schutzvorrichtung des Organismus“, die der Kanzerogenese entgegenwirkt [Ehrlich, 1909]. Dieser Ansatz wurde jedoch aufgrund der noch fehlenden Kenntnis über die zellulären Mechanismen des Immunsystems nicht weiter verfolgt. Erst ab den 1950er Jahren etablierte sich die Idee des Immunsystems als Schutzmechanismus vor neoplastischen Veränderungen [Burnet, 1957; Thomas, 1959]. Hieraus entwickelte sich letzten Endes die „Hypothese der Immunüberwachung“, die besagt, dass Zellen des Immunsystems für die Erkennung und Eliminierung tumoröser Zellen ausschlaggebend sind [Burnet, 1970]. Untermauert wurde diese Annahme durch Tierversuche, in welchen immundefiziente Mäuse, im Vergleich zu immunkompetenten Mäusen, ein häufigeres Auftreten spontaner oder chemisch induzierter Tumoren zeigten. Gleichzeitig wiesen die in immundefizienten Individuen gebildeten Tumoren eine höhere Immunogenität auf.

Die Fähigkeit des Immunsystems, immunogene Tumorzellen zu eliminieren, jedoch zugleich das Wachstum von Tumoren mit reduzierter Immunogenität zu fördern, wird als „Immuneditierung“ bezeichnet [Shankaran et al., 2001; Dunn et al., 2002]. Dieser Prozess gliedert sich in drei Phasen: Eliminierung, Equilibrium und *Escape* [Dunn et al., 2004]. In der Eliminierungsphase werden Tumorzellen von Zellen des Immunsystems erkannt und lysiert. Die Immunogenität maligner Zellen wird durch deren verändertes Proteinexpressionsprofil bestimmt, welches in der Regel vom Immunsystem erkannt werden kann. Hierbei wird zwischen tumorspezifischen (TSA) und tumorassoziierten Antigenen (TAA) unterschieden. TSAs sind Neoantigene, welche ausschließlich in Tumorzellen vorkommen, während sich TAAs ebenfalls in gesunden Zellen finden, jedoch im stärkeren Maß von malignen Zellpopulationen exprimiert werden [Rosenberg, 1999; Morris et al., 2003]. Die Erkennung derartiger Antigene erfolgt über ihre intrazelluläre Prozessierung und die anschließende Präsentation der dabei generierten Peptide an der Zelloberfläche durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*Major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I. Dort werden sie mittels rekombinationsabhängiger, klonal exprimierter T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR) und des Ko-Rezeptors CD8 von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen (*Cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) erkannt und ermöglichen das Abtöten der malignen Zellen [Zinkernagel und Doherty, 1979]. In der darauf folgenden Equilibriumsphase herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Immunabwehr und dem Tumorwachstum. Hierbei wird das Auswachsen des Tumors durch das Immunsystem weiterhin kontrolliert, jedoch entstehen neue Zellklone mit geringer oder fehlender Immunogenität. Einige dieser Tumorzellvarianten sind letzten Endes in der Lage, dem Immunsystem

zu entkommen und auszuwachsen (*Escape-Phase*). Ursachen hierfür können beispielsweise die Ausbildung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine, Stimulierung immunsuppressiver Zellen oder Generierung eines hypoxischen Umfelds sein [Munn und Bronte, 2016]. Des Weiteren können Krebszellen durch die Herunterregulation von MHC I-Molekülen der TCR-vermittelten Erkennung entgehen [Mittal et al., 2014]. Eine fehlende oder reduzierte MHC I-Expression führt jedoch zur Aktivierung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), über einen Mechanismus, der durch die *Missing self*-Hypothese erklärt wird [Karre et al., 1986; Ljunggren und Kärre, 1990].

1.2 Natürliche Killerzellen

1.2.1 Funktion

NK-Zellen wurden Mitte der 1970er Jahre entdeckt [Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975]. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und stellen die erste Verteidigungslinie gegen virusinfizierte und maligne Zellen dar. NK-Zellen sind vor allem im lymphatischen und extralymphatischen Gewebe wie Knochenmark, Milz und Lymphknoten lokalisiert oder zirkulieren im peripheren Blut, in welchem sie bis zu 15 % aller mononukleären Zellen (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) ausmachen [Robertson und Ritz, 1990]. Ihre Entwicklung erfolgt aus pluripotenten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks über *Common lymphoid progenitor* (CLP)-Zellen, aus welchen sich die Vorläuferzellen aller Lymphozytenpopulationen entwickeln [Blom und Spits, 2006]. Da Interleukin (IL)-15 sowohl für die Differenzierung und Reifung als auch für das Überleben von NK-Zellen eine entscheidende Rolle spielt, stellt die Hochregulierung des IL-15-Rezeptorkomplexes einen wichtigen Schritt in der NK-Zell-Entwicklung dar [Boos et al., 2008; Becknell und Caligiuri, 2005]. Dieser besteht aus den Untereinheiten IL-15R α (CD215), IL-2/IL-15R β (CD122) und der gemeinsamen Gamma-Kette (*Common gamma chain*, γ_c ; CD132) [Budagian et al., 2006]. Die fortlaufende Differenzierung zu reifen NK-Zellen zeigt sich durch die abnehmende Expression von CD34 beziehungsweise die schrittweise Zunahme der Oberflächenexpression von CD56, NKp46, NKG2D (*Natural killer group 2D*) und CD94/NKG2A (*Natural killer group 2A*). Weiter differenzierte NK-Zell-Populationen weisen eine gesteigerte Expression von Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) und CD16 auf [Yu et al., 2013]. Der Immunphänotyp reifer NK-Zellen wird durch die Marker CD3 und CD56 definiert (CD3⁻CD56⁺) [Robertson und Ritz, 1990]. Anhand der Ausprägung der Expression der Marker CD56 und CD16 lassen sich weitere Subpopulationen definieren, die sich sowohl in ihren immunologischen

Aufgaben als auch in ihrer Lokalisierung im Gewebe unterscheiden [Cooper et al., 2001; Caligiuri, 2008].

CD56^{bright}CD16^{dim}-Zellen machen den Hauptteil der NK-Zellen im lymphatischen Gewebe aus und werden durch ihr hohes Potenzial zur Zytokinsekretion von beispielsweise Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) charakterisiert. Sie stellen die immunregulatorische Population der NK-Zellen dar und zeichnen sich durch eine geringe Zytotoxizität aus. CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen sind hingegen hoch zytotoxisch und sekretieren nur im geringen Maß Zytokine. Sie stellen 90 % der zirkulierenden NK-Zellen im peripheren Blut dar [Poli et al., 2009]. Verglichen mit CD56^{bright}CD16^{dim}-Zellen weisen sie eine geringere Proliferationsrate auf. So nimmt bei fortschreitender Reifung die Proliferationsrate von NK-Zellen ab, während sich deren zytotoxische Aktivität erhöht [Cooper et al., 2001]. Die Lokalisierung der Subpopulationen wird von Chemokinen und den zugehörigen Rezeptoren reguliert. So weisen CD56^{bright}-Zellen vor allem eine erhöhte Expression von *CXC-chemokine receptor 3* (CXCR3) und *CC-chemokine receptor 7* (CCR7) auf, welche nach Aktivierung eine Lokalisierung zu den sekundären lymphatischen Organen zur Folge hat. Hingegen zeigt sich eine verstärkte Expression von CXCR1 und CX₃CR1 auf der Oberfläche von CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen, die nach Stimulierung zu einer Anreicherung der Zellen in inflammatorischem, peripherem Gewebe führt [Campbell et al., 2001].

NK-Zellen definieren sich als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Sowohl dendritische Zellen (*Dendritic cells*, DCs) wie auch T-Zellen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Im Rahmen eines positiven *Feedback-Loops* führt die Stimulation von NK-Zellen zur Freisetzung von IFN γ und TNF α und damit zur Induktion der Aktivierung und anschließenden Reifung dendritischer Zellen von iDCs (*Immature DCs*) zu mDCs (*Mature DCs*). Deren folgende Sekretion von IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert wiederum die NK-Zellen, was sich sowohl in einer Steigerung ihrer IFN γ -Sekretion sowie ihrer zytotoxischen Aktivität äußert [Walzer et al., 2005]. Die mDC-Population wird im Rahmen der DC-Editierung von NK-Zellen reguliert. iDCs weisen im Vergleich zu mDCs eine geringere Oberflächenexpression von Liganden inhibierender NK-Zell-Rezeptoren wie HLA (*Human leucocyte antigen*) Klasse I-Moleküle und HLA-E auf, was bei NK-Zell-Kontakt zu deren Lyse führt. Hierdurch wird die Population reifer DCs gefördert [Chiesa et al., 2003]. Diese sind in der Lage, die nach NK-Zell-vermittelter Tumorzelllyse freigesetzten Tumorantigene aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC I- und II-Moleküle T-Zellen zur Aktivierung zu präsentieren. Hieraus folgt eine TH₁-Polarisierung von CD4-positiven T-Zellen beziehungsweise die Differenzierung CD8-positiver T-Zellen zu CTLs (*Cross-priming*). Zugleich sind NK-Zellen in der Lage, mittels Sekretion von IFN γ die TH₁-Polarisierung direkt zu unterstützen [Martín-Fontecha et al., 2004].

1.2.2 Regulierung der NK-Zell-Aktivität

Im Vergleich zu T- und B-Zellen, deren Immunantwort eine Antigen-spezifische Aktivierung und klonale Selektion erfordert, benötigen NK-Zellen keine Sensibilisierung. Sie besitzen keinen spezifischen Rezeptor, der nur gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, sondern verfügen über ein breites Repertoire an Keimbahn-kodierten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, welches sich während ihrer Reifung herausbildet [Raulet et al., 2001]. Die Reifung der NK-Zellen zu Effektorzellen erfolgt während des sogenannten *Licensing*-Prozesses durch die Interaktion inhibitorischer Rezeptoren mit körpereigenen MHC I-Molekülen. Bei Zellen ohne passende inhibierende Rezeptoren führt das Ausbleiben einer solchen Interaktion hingegen zu einem anergischen Zustand und verhindert somit eine NK-Zell-vermittelte Autoreaktivität [Kim et al., 2005; Anfossi et al., 2006]. Zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren zählen die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*Natural cytotoxicity receptors*, NCRs) NKp30, NKp46 und NKp44, welche Typ I Transmembranproteine der Immunglobulin (Ig)G-ähnlichen Familie darstellen. NKp30 und NKp46 werden von der Mehrheit ruhender NK-Zellen und in erhöhtem Maß von aktivierten NK-Zellen exprimiert. NKp44 hingegen wird im ruhenden Zustand ausschließlich von CD56^{bright}-Zellen und erst nach Zytokinstimulierung von allen Subpopulationen exprimiert [Sivori et al., 2019]. Ein weiterer Rezeptor zur Aktivierung der NK-Zell-Zytotoxizität ist NKG2D. Dies ist ein Rezeptor der C-Typ Lektin-ähnlichen Familie, der als Homodimer unter anderem auf NK-Zellen, CD8-positiven T-Zellen und NKT-Zellen exprimiert ist. NKG2D-Liganden sind die MHC I-ähnlichen Moleküle MICA/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) und ULBP1-6 (*UL-16 binding protein 1-6*) [Lazarova et al., 2020].

Liganden aktivierender Rezeptoren weisen eine niedrige Oberflächenexpression auf gesundem Gewebe auf, werden jedoch nach zellulärem Stress wie DNA-Schädigung oder Hitzeschock, viraler Infektion und Tumortransformation hochreguliert und stimulieren hierdurch die Antitumoraktivität von NK-Zellen (*Induced self-Hypothese*) [Pegram et al., 2011]. Im Rahmen der *Escape*-Phase können Tumorzellen jedoch der Lyse durch NK-Zellen beispielsweise durch Herunterregulierung von Liganden aktivierender Rezeptoren entgehen [Ljunggren und Malmberg, 2007]. Darüber hinaus kann die Abspaltung (*Shedding*) der membranständigen Liganden durch Metalloproteasen lösliche Formen generieren. Diese sind beispielsweise im Serum von Krebspatienten zu finden und mit einer reduzierten Oberflächenexpression oder Inhibierung der korrespondierenden aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen assoziiert [Zingoni et al., 2016]. B7-H6, ein NKp30-Ligand, findet sich auf Tumorzellen verschiedener Krebsarten, unter anderem beim Neuroblastom. Das Ausmaß von löslichem B7-H6 korreliert hierbei mit der Tumorprogression und Resistenz gegenüber Chemotherapie [Semeraro et al., 2015a]. Ebenso weisen Leukämienstammzellen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine geringere oder fehlende Oberflächenexpression aktivierender

NKG2D-Liganden auf [Raulet et al., 2013; Paczulla et al., 2019]. Ein weiterer aktivierender Rezeptor von NK-Zellen ist CD16 (FcγRIIIα), ein niedrig affiner Rezeptor für IgG-Moleküle, der vor allem von CD56^{dim}-NK-Zellen exprimiert wird. Durch Bindung an IgG-opsonierte Zielzellen wird CD16 aktiviert und induziert *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) [Medjouel Khlifi et al., 2022].

NK-Zell-Effektorfunktionen werden durch die Integration aktivierender und inhibierender Signale reguliert. Im ruhenden Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Signalen, welches jedoch durch die erhöhte Stimulation aktivierender Rezeptoren (*Induced self*) oder durch das Fehlen inhibitorischer Signale (*Missing self*) zugunsten einer NK-Zell-Aktivierung verschoben werden kann (siehe Abb. 1.1) [Long et al., 2013].

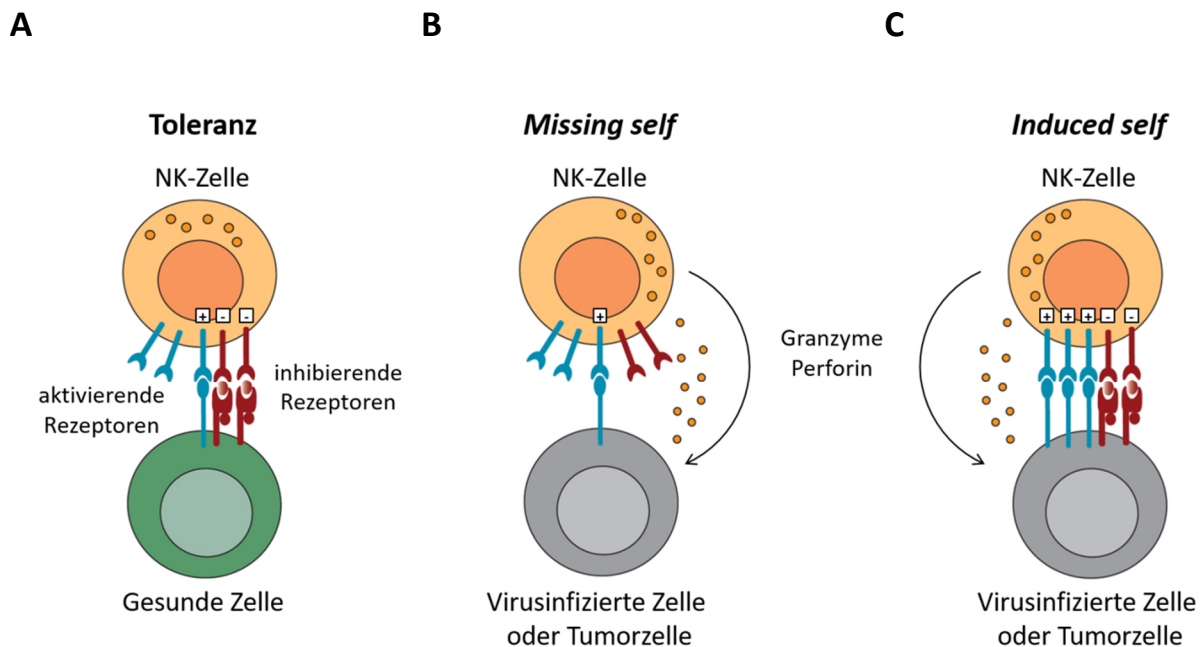


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der NK-Zell-Aktivierung. (A) **Toleranz.** Bei Kontakt mit gesunden Zellen wird die Stimulation aktivierender NK-Zell-Rezeptoren durch inhibierende Signale kompensiert. Dies führt zur Toleranz der NK-Zellen gegenüber körpereigenen Zellen. (B) **Missing self.** Eine mögliche Herunterregulation von MHC I-Molekülen auf virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen führt zu vorwiegend aktivierenden Signalen, welche die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen induzieren. (C) **Induced self.** Geschädigte Zellen und Tumorzellen können von einer Überexpression stress-induzierter Liganden geprägt sein, welche den durch MHC I-Moleküle vermittelten inhibitorischen Signalen entgegenwirken. Die hierdurch vorwiegende Stimulation aktivierender NK-Zell-Rezeptoren führt zur Lyse der Zielzellen (modifiziert nach [Vivier et al., 2012]).

Die Weiterleitung aktivierender Signale erfolgt über Adaptormoleküle, deren zytoplasmatische Region mindestens ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) enthält, welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Diese wird nach Ligandenbindung durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb der ITAM-Sequenzen durch Kinasen der Src-Familie induziert. Hierdurch werden weitere Kinasen der Syk-

Familie wie Syk oder ZAP-70 rekrutiert, welche eine anschließende Signalaktivierung unter anderem über den Vav2-, Vav3- und MAPK-Signalweg bewirken [Lanier, 2001; Tassi et al., 2006]. Die in NK-Zellen exprimierten Adaptormoleküle sind zum einen CD3 ζ - und Fc ϵ R1 γ -Homo- oder Heterodimere, welche unter anderem mit NKp30, NKp46 und CD16 interagieren, und zum anderen *DNAX activating protein of 12 kDa* (DAP12)-Homodimere, die mit dem aktivierenden Rezeptor NKp44 assoziieren. Aktivierende Signale von humanem NKG2D werden durch das Adaptormolekül DAP10 (*DNAX activating protein of 10 kDa*) beziehungsweise von murinem NKG2D durch DAP10 oder DAP12 vermittelt [Rosen et al., 2004]. DAP10 enthält anstelle der ITAM-Sequenz ein YINM-Motiv, das nach Tyrosin-Phosphorylierung zur Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- oder *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2)-vermittelten Signalwegs führt [Lanier, 2001]. Des Weiteren kann der Effekt aktivierender Rezeptoren wie NKp46 oder NKG2D auf die Zytotoxizität von NK-Zellen durch die gleichzeitige Expression und Stimulation von Ko-Rezeptoren wie 2B4 oder DNAM-1 verstärkt werden [Bryceson et al., 2006].

Aktivierende Signale werden jedoch durch die Expression von HLA I-Molekülen, welche sich auf gesundem Gewebe befinden, blockiert. Dies geschieht nach Bindung von MHC I-Liganden mittels der Tyrosyl-Phosphorylierung von ITIMs (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), welche sich in der zytoplasmatischen Domäne von inhibitorischen Rezeptoren befinden. Es folgt die Rekrutierung der *Src homology 2* (SH2)-Domänen enthaltenden Phosphatasen-1 und -2 (SHP-1, -2), welche anschließend die Dephosphorylierung und Inaktivierung aktivierender Rezeptoren bewirken [Long, 1999]. Zu den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren zählen KIRs, welche der Ig-Superfamilie angehören. Die KIR-Familie besteht aus jeweils sieben aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, welche entweder zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) Ig-artige extrazelluläre Domänen beziehungsweise eine kurze (*Short*, S) oder lange (*Long*, L) intrazelluläre Domäne besitzen (KIR2DS, KIR2DL). KIRs mit langen intrazellulären Domänen leiten inhibitorische Signale weiter, KIRs mit kurzen Domänen wirken hingegen aktivierend. Liganden der inhibitorischen KIRs sind größtenteils die klassischen MHC I-Moleküle HLA-A, -B und -C [Purdy und Campbell, 2009]. Einen weiteren inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor stellt das NKG2A/CD94-Heterodimer dar. Dieses gehört der Typ II Glykoprotein-Familie mit Lektin-ähnlichen Domänen an und wird nach Bindung des nicht-klassischen MHC I-Moleküls HLA-E aktiviert [Long, 1999]. Im frühen Reifungsstadium von NK-Zellen zeigt sich zunächst eine höhere Expression von NKG2A, die jedoch im Laufe des Reifungsprozesses herunterreguliert wird. KIRs hingegen werden verstärkt auf der reiferen NK-Zellpopulation exprimiert, welche sich hiermit durch den Immunphänotyp CD56^{dim}NKG2A⁻KIR⁺ definiert [Björkström et al., 2010].

1.2.3 Mechanismen der NK-Zell-Zytotoxizität

Die Aktivierung der NK-Zell-vermittelten Antitumoraktivität erfordert den Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle, der in die Ausbildung einer funktionellen immunologischen Synapse (IS) mündet [Orange, 2008]. Dieser Begriff wurde bereits in den 1990er Jahren zur Beschreibung der Verbindung zwischen T-Zellen und APCs (*Antigen-presenting cells*) eingeführt [Grakoui et al., 1999]. Die Ausbildung einer immunologischen Synapse kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiierungs-, Effektor- und Terminierungsphase [Orange, 2008]. Der Initiierungsschritt wird durch eine schwache Verbindung zwischen Effektor- und Zielzellen eingeleitet, welche im weiteren Verlauf durch Adhäsionsmoleküle wie das Integrin LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*), das an das Transmembranprotein ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) auf Zielzellen bindet, verstärkt wird [Liu et al., 2009]. Die Bindung an Liganden führt zu einer Akkumulation von NK-Zell-Rezeptoren, was letzten Endes zur Bildung einer vollentwickelten IS führt. Die Weiterleitung hauptsächlich aktivierender Signale führt zur Ausbildung einer zytotoxischen IS, in welcher sich Rezeptoren, Signalmoleküle und Bestandteile des Zytoskeletts in Form eines SMAC (*Supramolecular activation cluster*) oder von Microclustern ansammeln. Zu Beginn der Effektorphase erfolgt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, welches sich durch die VAV-1 induzierte Ausbildung eines Netzwerks aus F-Aktin (*Filamentous actin*) definiert [Orange, 2008; Graham et al., 2006]. Nach Aktivierung der NK-Zelle kann die Lyse der Zielzelle über zwei verschiedene Wege vermittelt werden, zum einen über die Freisetzung lytischer Granula, zum anderen durch Todesrezeptor-induzierte Apoptose [Prager und Watzl, 2019]. In der anschließenden Terminierungsphase kommt es zur Herunterregulierung akkumulierter aktivierender Rezeptoren und der Abtrennung der NK-Zelle von der Zielzelle. Dies ermöglicht die nachfolgende Lyse einer weiteren Zielzelle in einem Prozess, der als *Serial killing* bezeichnet wird [Bhat und Watzl, 2007]. Eine überwiegend inhibitorische Signalweiterleitung während der Initiierungsphase führt hingegen zur Ausbildung einer inhibitorischen IS, welche sich in der Akkumulation von inhibitorischen KIRs und entsprechenden Ko-Rezeptoren zu einem sogenannten SMIC (*Supramolecular inhibitory cluster*) äußert. In diesem Fall bleibt die Umstrukturierung des Zytoskeletts aus und die Ablösung der Effektorzelle wird induziert [Orange, 2008].

Wie oben erwähnt, können NK-Zellen die Apoptose der Zielzellen über zwei unterschiedliche Mechanismen einleiten [Prager und Watzl, 2019]. Wird der Zelltod durch die Mediatoren Granzym und Perforin vermittelt, erfolgt innerhalb der NK-Zelle zunächst der Transport lytischer Granula mittels Dynein längs der Mikrotubuli in Richtung *Microtubule organizing centre* (MTOC). Während der folgenden Umlagerung des Zytoskeletts polarisiert der MTOC/Granula-Komplex in Richtung der immunologischen Synapse, in welche nach Fusionierung der Granulamembran mit der

Einleitung

Plasmamembran der NK-Zellen der zytotoxische Inhalt freigesetzt wird [Mentlik et al., 2010; de Saint Basile et al., 2010]. Zytotoxische Granula von NK- und CD8-positiven T-Zellen enthalten neben dem Protein Perforin Serinproteasen der Gruppe der Granzyme. Perforin, welches nach Sekretion durch den neutralen pH-Wert und eine hohe Konzentration an Ca^{2+} -Ionen im extrazellulären Raum aktiviert wird, oligomerisiert und bildet Poren in der Membran von Zielzellen. Dies ermöglicht die Aufnahme der Granzyme in die Zielzellen, entweder auf direktem Weg oder über den Mechanismus der Endozytose. Nach Freisetzung im Zytoplasma induzieren Granzyme die Apoptose der Zielzelle über verschiedene Signalwege. Am meisten ist dabei über die Wirkung von Granzym B (GrB) bekannt, das die Apoptose über unterschiedliche Mechanismen einleiten kann. Zum einen aktiviert GrB die Caspasen 3 und 7 und induziert dadurch den Caspase-abhängigen Zelltod durch die nachfolgende Spaltung von Caspase-Substraten im Zytosol und im Zellkern [Prager und Watzl, 2019]. Zum anderen kann GrB Caspase-Substrate wie ICAD (*Inhibitor of the caspase-activated DNase*) oder das BH3-only Protein Bid auch direkt spalten. Die proteolytische Aktivierung von Bid leitet einen mitochondrialen Signalweg der Apoptose ein [Boivin et al., 2009; Prager und Watzl, 2019]. Hierbei wird aus Bid nach Spaltung durch GrB die verkürzte Version tBid (*Truncated Bid*) generiert, welche durch Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak eine gesteigerte Membranpermeabilität herbeiführt. Dies hat die Sekretion von Cytochrom C (CytC) in das Zytosol und dessen Bindung an Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) zur Folge. Apaf-1 setzt sich aus der N-terminalen Region CARD (*Caspase recruitment domain*), NOD (*Nucleotide-binding and oligomerization domain*) und einer C-terminalen, regulatorischen Domäne (WD40) zusammen. Durch die Interaktion von CytC und der WD40-Sequenz wird Apaf-1 aktiviert, was unter Verbrauch von ATP zu dessen anschließender Oligomerisierung und der Bildung des Apoptosoms bestehend aus sieben Apaf-1-Molekülen führt. Es folgt die Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase 9 durch die homotypische Wechselwirkung der CARDS der Caspase 9 und des Apoptosoms [Riedl und Salvesen, 2007]. Caspase 9 aktiviert anschließend die Effektor-Caspasen 3 und 7, woraufhin die Apoptose der Zielzelle eingeleitet wird [Boivin et al., 2009].

Ein weiterer Mechanismus zur Abtötung basiert auf der Aktivierung von Todesrezeptoren, welche auf der Oberfläche von Zielzellen exprimiert werden. Diese gehören der TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*)-Superfamilie an und sind durch ihre zytoplasmatische Domäne DD (*Death domain*) charakterisiert. Die bekanntesten Vertreter der TNFR-Superfamilie sind TNFR1, CD95 (Fas) und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) R1/2 [Bodmer et al., 2002]. Der Ligand von TNFR1 ist das Zytokin $\text{TNF}\alpha$, welches unter anderem von Makrophagen, Monozyten, NK- und T-Zellen sekretiert wird. Die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ führt zur Oligomerisierung von TNFR1 und der folgenden Ablösung der SODD (*Silencer of death domain*), wodurch die DD zugänglich wird. Dies ermöglicht die Bindung des

Adaptorproteins TRADD (*TNF receptor associated death domain*). Durch die Rekrutierung weiterer regulatorischer Proteine wie RIP1 (*Receptor interacting protein 1*), TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*) beziehungsweise cIAP (*Cellular inhibitor of apoptosis*) 1 und 2 erfolgt die Bildung des Komplexes I. Im darauf folgenden Schritt wird Komplex I internalisiert, worauf die Degradierung von cIAP 1 und 2 sowie die Interaktion mit FADD (*Fas associated DD containing protein*) folgt. Nach anschließender Bindung der Pro-Caspasen 8 und 10 an FADD entwickelt sich Komplex I zu Komplex II (DISC, *Death inducing signaling complex*), welcher den apoptotischen Signalweg einleitet [Shuh et al., 2013]. Weitere Liganden von Todesrezeptoren, welche sich auf der Oberfläche aktivierter T- und NK-Zellen befinden, sind FasL, der Ligand von CD95, und TRAIL, welcher an TRAILR1 und 2 bindet. Bei diesen erfolgt die Initiierung der Apoptose mittels der Bildung des DISC durch die Interaktion von FADD mit dem Rezeptor und der anschließenden Rekrutierung der Pro-Caspasen 8 und 10. Die Weiterleitung apoptotischer Signale erfolgt entweder direkt oder nach Internalisierung des DISC. Hierbei wird die Apoptose der Zielzellen entweder durch den mitochondrialen Signalweg oder mittels Aktivierung von Effektor-Caspasen eingeleitet [Prager und Watzl, 2019; Peter und Krammer, 2003; von Karstedt et al., 2017].

1.3 NK-Zellen in der Krebsimmuntherapie

1.3.1 Zelluläre Immuntherapie mit NK-Zellen

NK-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Tumor-Immunüberwachung. Es zeigte sich in einigen Studien, dass eine geringere NK-Zell-Aktivität mit einem erhöhten Krebsrisiko beziehungsweise einer schlechteren Prognose korreliert [Imai et al., 2000; Guerra et al., 2008; Street et al., 2004; Semeraro et al., 2015b]. Obwohl NK-Zellen nicht die vorwiegende Lymphozyten-Population in Tumoren darstellen, leisten sie einen bedeutenden Beitrag in der Generierung eines pro-inflammatorischen Milieus durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, welche wiederum Einfluss auf die T- und B-Zell-Antwort nehmen [Malmberg et al., 2017]. Für die Immunogenität des Tumors und dessen Erkennung durch T-Zellen ist unter anderem die Präsentation von Tumorantigenen via MHC I-Molekülen maßgebend. Diese ist im *Escape*-Stadium jedoch eingeschränkt und verhindert somit die Tumorzelllyse durch zytotoxische T-Zellen. Hier tragen NK-Zellen eine entscheidende Funktion bei, da sie durch das Fehlen der MHC I-Expression (*Missing self*) aktiviert werden und im Gegensatz zu T-Zellen Antigene auch MHC I-unabhängig erkennen können [Karre et al., 1986; Ljunggren und Kärre, 1990; Rosenberg und Huang, 2018]. Ebenso weisen allogene NK-Zellen nach adoptivem Transfer ein niedrigeres GvHD (*Graft versus host disease*)-Risiko im Vergleich zu Spenderlymphozyten-Infusionen (*Donor lymphocyte infusion*, DLI) mit allogenen T-Zellen

auf [Cooley et al., 2019; Ruggeri et al., 2002]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden deutliche Fortschritte beim Einsatz von NK-Zellen in der Krebsimmuntherapie als *Living drugs* erzielt. Solche therapeutischen NK-Zellen werden aus PBMCs, CD34-positiven Vorläufer-Zellen, iPSCs (*Induced pluripotent stem cells*), Plazenta oder Nabelschnurblut gewonnen [Shimasaki et al., 2020].

Zu Beginn der 1980er Jahre wurden NK-Zellen erstmals durch Isolierung autologer PBMCs und Stimulation mit IL-2 als LAK (*Lymphokine-activated killer*)-Zellen in der adoptiven Immuntherapie zur Behandlung von malignen Erkrankungen wie Nierenkrebs oder dem metastasierenden Melanom eingesetzt [Rosenberg, 1985; Bordignon et al., 1999]. In späteren Phase II und III Studien konnte durch die Gabe von LAK-Zellen in Kombination mit IL-2 im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von IL-2 jedoch kein verbesserter Therapieerfolg erzielt werden [Margolin et al., 1991; Law et al., 1995]. Nachfolgende Studien zeigten nach dem adoptiven Transfer autologer NK-Zellen ebenfalls nur begrenzt Erfolg. Zum einen befinden sich NK-Zellen von Krebspatienten oft in einem anergischen Zustand, der deren Antitumoraktivität beeinträchtigt. Zum anderen sind Tumorzellen in der Lage, durch Hochregulierung ihrer MHC I-Moleküle autologe NK-Zellen zu hemmen [Tonn et al., 2001]. Dem konnte durch den Transfer allogener NK-Zellen gesunder Spender entgegengewirkt werden. In einer Studie von Ruggeri et al. wurde gezeigt, dass alloreaktive NK-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen in AML-Patienten nach Stammzelltransplantation zu lysieren ohne dabei GvHD auszulösen. Die hierbei beobachtete Alloreaktivität der Spender-NK-Zellen gegenüber dem Empfänger lässt sich auf einen KIR-Liganden *Mismatch* zurückführen [Ruggeri et al., 2002]. In weiteren Studien wurden allogene NK-Zellen sowohl zur Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen als auch solider Tumoren eingesetzt [Miller et al., 2005; Geller et al., 2011]. Eine Herausforderung bei der Nutzung von NK-Zellen in der Krebsimmuntherapie liegt unter anderem in der aufwendigen Isolierung und begrenzten *ex vivo* Expansion. Bei einem Großteil der klinischen Studien werden allogene NK-Zellen aus PBMCs gesunder Spender gewonnen. Eine potenzielle Kontamination mit T- oder NKT-Zellen erhöht hierbei das Risiko einer GvHD. Mögliche zusätzliche Aufreinigungsschritte wie der Einsatz magnetischer *Beads* mit gebundenem anti-CD3 Antikörper zur Abreicherung von T-Zellen sind kostenintensiv [Klingemann und Martinson, 2004]. Als alternative NK-Zell-Quelle werden in neueren Studien aus CD34-positiven Stammzellen des Nabelschnurblutes *in vitro* differenzierte NK-Zellen als leichter zugängliches *off-the-shelf* Produkt genutzt [Dolstra et al., 2017; Spanholtz et al., 2010]. Eine weitere Herausforderung für den therapeutischen Einsatz von NK-Zellen stellt deren relativ kurze Lebensdauer *in vivo* nach adoptivem Transfer dar. Des Weiteren gelangen adoptiv transferierte NK-Zellen zeitnah in einen Erschöpfungszustand, welcher unter anderem durch die Herunterregulation aktivierender Rezeptoren definiert ist [Gill et al., 2012]. Um die Antitumoraktivität und Langlebigkeit von NK-Zellen in der adoptiven Immuntherapie zu steigern,

werden diese daher unter Nutzung verschiedener Strategien stimuliert. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Zugabe immunstimulatorischer Zytokine wie IL-2, -12, -15 und -18 [Romee et al., 2014]. Daneben werden auch Antikörper zur Blockade inhibitorischer Rezeptoren [Vey et al., 2018; Koh et al., 2001] oder zur Vernetzung von NK-Zell-Rezeptoren und Tumorantigenen (*Engager*) eingesetzt [Vallera et al., 2020; Warlick et al., 2020; Zhang et al., 2021].

1.3.2 Zytokin-basierte Krebsimmuntherapie

Die Stimulation isolierter NK-Zellen mit Zytokinen der γ -Familie wie IL-2 und IL-15 führt zu einer erhöhten Proliferation und antitumoralen Aktivität [Becknell und Caligiuri, 2005]. Die Bindung von IL-2 und IL-15 induziert die Aktivierung der Tyrosinkinase JAK1 und JAK3, welche anschließend die Phosphorylierung von *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteinen wie STAT5 initiieren, die in den Kern translozieren und dort Gene regulieren, die maßgeblich für die Proliferation, Reifung, Aktivierung und das Überleben von NK-Zellen sind [Waldmann et al., 1998; Ellery und Nicholls, 2002; Gotthardt und Sexl, 2017]. IL-2 wird unter anderem von aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen und B-Zellen sekretiert und bindet daraufhin an den IL-2-Rezeptorkomplex, bestehend aus den Untereinheiten IL-2R α , IL-2R β und γ [Setoguchi et al., 2005; Stauber et al., 2006]. IL-2R β und γ bilden den *Intermediate affinity*-Rezeptor, welcher IL-2 mit mittlerer Affinität bindet und konstitutiv auf T- und NK-Zellen exprimiert ist. Die anschließende Assoziierung mit der IL-2R α -Untereinheit, welche konstitutiv auf Treg (*regulatory T cells*)-Zellen und aktivierten NK- und T-Zellen exprimiert ist, führt zur Bildung des *High affinity*-Rezeptors. Dieser ist in der Lage, mit hoher Affinität an IL-2 zu binden [Stauber et al., 2006]. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zu einer gesteigerten Proliferation und Zytotoxizität von NK-Zellen sowie zur Differenzierung und Aktivierung CD8-positiver T-Zellen [Jiang et al., 2016]. Andererseits kann IL-2 zur Induzierung von AICD (*Activation induced cell death*) sowie zur Aktivierung immunsuppressiver Tregs beitragen und hierdurch der antitumoralen Immunantwort entgegenwirken [Lenardo, 1991; Sakaguchi et al., 1995; Nelson, 2004].

IL-15 ist strukturell und funktionell mit IL-2 verwandt, was auf die gemeinsamen IL-2/IL-15R β - und γ -Ketten ihrer Rezeptoren und die Signalübertragung mittels des JAK-/STAT-Signalwegs zurückzuführen ist [Fehniger et al., 2002]. IL-15 wird von DCs und Monozyten gebildet und zusammen mit der hoch affinen Rezeptoreinheit IL-15R α als membrangebundenes Heterodimer an der Oberfläche präsentiert oder nach proteolytischer Spaltung durch Metalloproteasen in löslicher Form sekretiert. In löslicher Form kann IL-15R α als IL-15-Antagonist wirken [Mortier et al., 2004]. Der an der Membran gebundene IL-15/IL-15R α -Komplex interagiert mit dem *Intermediate affinity*-Rezeptor anderer Immunzellen (*Trans*-Präsentation) und induziert nach Bildung des *High affinity*-Rezeptors die JAK-

/STAT-vermittelte Signalkaskade [Dubois et al., 2002]. Trotz überwiegend ähnlicher Funktion gibt es auch Unterschiede zwischen IL-2 und IL-15. IL-15 fördert die Erhaltung CD8-positiver T-Gedächtniszellen und wirkt unter anderem durch Hemmung des IL-2-vermittelten AICD der Apoptose entgegen. Im Gegensatz dazu fördert IL-2 nicht nur AICD, sondern auch die Erhaltung regulatorischer T-Zellen, während die Persistenz der T-Gedächtniszellen inhibiert wird [Waldmann, 2003]. Vor dem klinischen Einsatz von IL-15 wurde dessen Sicherheit in verschiedenen Studien in Rhesusaffen bestätigt. Hierbei wurden Toxizitäten wie Hypotonie oder das Kapillarlecksyndrom, welche bei der systemischen Injektion von rekombinantem IL-2 (rIL-2) auftraten, nach Gabe von humanem rIL-15 nicht beobachtet [Waldmann et al., 2011]. Die Wirksamkeit von löslichem rIL-15 ist jedoch aufgrund einer geringen Halbwertszeit beeinträchtigt, da für seine Stabilität die Bindung an IL-15R α entscheidend ist [Knudson et al., 2020]. Zur Optimierung wurden daher Komplexe aus IL-15 und IL-15R α , sogenannte IL-15-Superagonisten, wie das Fusionsprotein RLI (*Receptor-linked IL-15*) und N-803 entwickelt [Mortier et al., 2006; Han et al., 2011]. N-803 ist ein Fusionsprotein aus einer mutierten Form von IL-15 (IL-15_{N72D}), der Sushi-Domäne des IL-15R α sowie einer IgG1-Fc-Domäne. IL15_{N72D} definiert sich durch den Austausch von Asparagin durch Asparaginsäure an der Aminosäureposition 72 und weist im Vergleich zu nativem IL-15 eine 4- bis 5-fach höhere biologische Aktivität auf [Zhu et al., 2009]. Die Sushi-Domäne des IL-15R α (Aminosäuren 1 bis 66), welche den Zytokin-bindenden Bereich der Rezeptoruntereinheit darstellt, dient der Nachbildung der *Trans*-Präsentation, während die IgG1-Fc-Domäne eine gesteigerte Halbwertszeit bedingt [Han et al., 2011; Van der Meer et al., 2021]. In präklinischen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der IL-15-Superagonist N-803 im Vergleich zu rIL-15 sowohl stabiler ist als auch mit einer höheren immunstimulatorischen Aktivität einhergeht [Knudson et al., 2020].

Um diesen stimulatorischen Effekt in der Krebsimmuntherapie auch zielgerichtet nutzen zu können, wurden IL-15-Superagonisten-basierte Immunzytokine entwickelt. Hierbei wurde das Zytokin mit Antikörpern gekoppelt, die gegen *Immune checkpoints* oder tumorassoziierte Antigene gerichtet sind. Dies erlaubt die Konzentrierung des Zytokins im Tumormilieu und trägt hierdurch zur Reduzierung einer möglichen systemischen Toxizität bei [Kontermann, 2012]. So setzt sich beispielsweise das Immunzytokin GD₂-RLI aus dem Fusionsprotein RLI, bestehend aus IL-15 und der Sushi-Domäne des IL-15R α , und einem spezifischen Antikörper gegen das Disialogangliosid GD₂ zusammen. In einem EL4-Lymphommodell in immunkompetenten Mäusen führte die intraperitoneale Injektion des GD₂-RLI-Immunzytokins zu einem verringerten Wachstum GD₂-positiver EL4-Zellen im Vergleich zu RLI allein oder RLI in Kombination mit einem GD₂-spezifischen Antikörper [Vincent et al., 2013]. Eine alternative Strategie stellt die genetische Modifizierung von NK-Zellen dar, durch welche sie entsprechende Zytokine entweder in löslicher oder

membranegebundener (*Membrane-bound*, mb) Form ektopisch exprimieren können. So führte die ektopische Expression von mBL-15 auf humanen NK-Zellen ohne Zugabe externer Stimuli zu verlängertem Überleben und einer gesteigerten Antitumoraktivität *in vitro* und *in vivo* [Imamura et al., 2014]. Aufgrund der lokalen Begrenzung der Zytokin-vermittelten Stimulierung kann durch eine derartige Modifikation von NK-Zellen auch das Risiko einer systemischen Toxizität verringert werden.

1.3.3 Genetische Modifikation mit chimären Antigenrezeptoren (CARs)

Eine vielversprechende Strategie zur Erhöhung des therapeutischen Nutzens und der zielgerichteten Antitumoraktivität zytotoxischer Lymphozyten ist deren Modifizierung mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) mittels lentiviraler oder retroviraler Transduktion. Klinische Studien zur Behandlung verschiedener B-Zell-Malignitäten mit CAR-exprimierenden T-Zellen erzielten erfolgversprechende Ergebnisse. Die Zulassung der ersten CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapie unter dem Handelsnamen Kymriah erfolgte im August 2017 durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). Diese basierte auf der Phase II Studie ELIANA, in welcher Patienten mit rezidivierender oder refraktärer akuter lymphatischer B-Zell-Leukämie (R/R B-ALL) mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen behandelt wurden. Die allgemeine ORR (*Overall remission rate*) betrug 82 % [Laetsch et al., 2022]. Mittlerweile wurden insgesamt fünf CAR-T-Zell-Produkte, welche spezifisch gegen die Antigene CD19 beziehungsweise BCMA (*B cell maturation antigen*) gerichtet sind, von FDA und EMA (*European Medicines Agency*) zugelassen.

CARs sind rekombinante, chimäre Transmembranproteine, die eine aus einem Antikörper abgeleitete Bindedomäne (*Single chain fragment variable*, scFv), bestehend aus den variablen Domänen der schweren (*Heavy*, V_H) und leichten (*Light*, V_L) Kette eines monoklonalen Antikörpers, mit den Signaltransduktions-Eigenschaften des T-Zell-Rezeptors verbinden [Uherek et al., 2001]. Dies ermöglicht eine MHC-unabhängige Erkennung spezifischer Tumorantigene auf der Oberfläche von Zielzellen [Eshhar et al., 1993]. Resistenzmechanismen wie die Herunterregulation von MHC I-Molekülen oder eine veränderte Antigenprozessierung können hierdurch umgangen werden. In CARs der ersten Generation ist die scFv-Domäne über eine flexible *hinge*-Region mit einer Transmembran- und einer intrazellulären Signaldomäne fusioniert, die entweder von der CD3ζ- oder FcεR1γ-Kette abgeleitet ist (siehe Abb. 1.2) [Eshhar et al., 1993]. CARs der zweiten Generation sind durch eine zusätzliche ko-stimulatorische Signaldomäne abgeleitet von Rezeptoren wie CD28, 4-1BB oder 2B4 definiert. Eine Kombination mehrerer ko-stimulatorischer Domänen in einem chimären Rezeptor führt zu CARs der dritten Generation [Uherek et al., 2001].

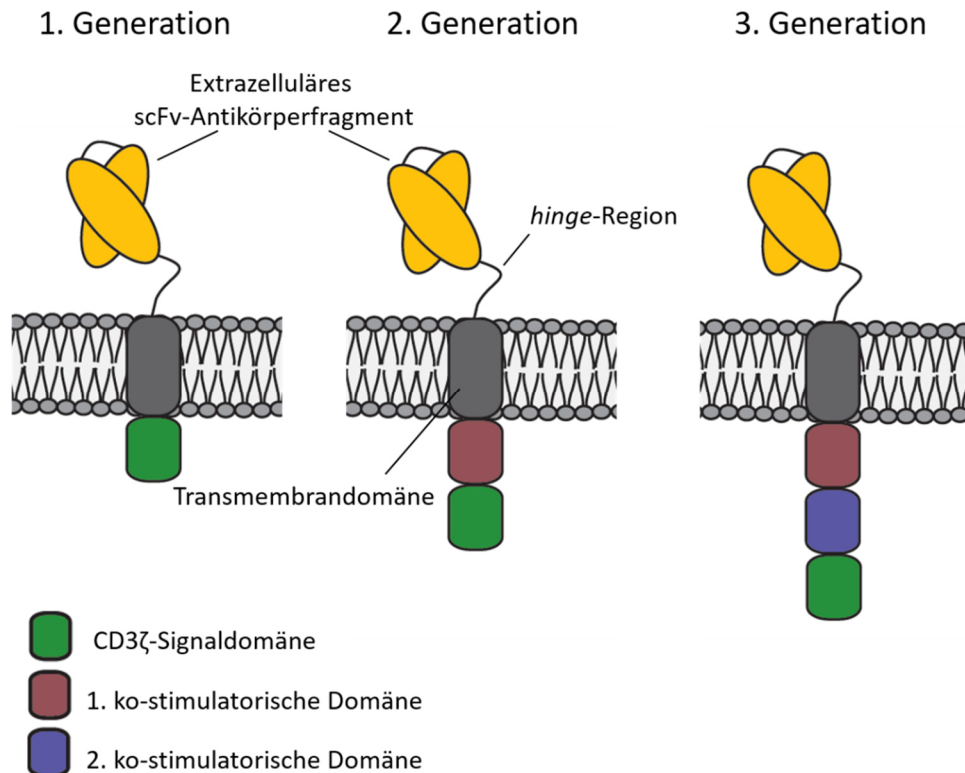


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus chimärer Antigenrezeptoren. CARs der 1. Generation bestehen aus einem extrazellulären scFv-Antikörperfragment, welches über eine flexible *hinge*-Region an eine Transmembran- und eine intrazelluläre CD3ζ-Signaldomäne fusioniert ist. CARs der 2. Generation enthalten eine zusätzliche ko-stimulatorische Signaldomäne abgeleitet von Rezeptoren wie CD28, 4-1BB oder 2B4, während CARs der 3. Generation mindestens zwei ko-stimulatorische Domänen aufweisen.

Neben CAR-T-Zellen stellen CAR-NK-Zellen einen weiteren vielversprechenden Effektorzelltyp für die adoptive Krebsimmuntherapie dar. Diese können im Gegensatz zu CAR-T-Zellen Tumorzellen zusätzlich auch CAR-unabhängig über ihre Keimbahn-kodierten aktivierenden Rezeptoren erkennen. Die CAR-vermittelte Antitumoraktivität ist dabei aber weitgehend unabhängig von endogen exprimierten aktivierenden Rezeptoren und kann somit *Escape*-Mechanismen des Tumors entgegenwirken. Dadurch wird die antitumorale Aktivität auch gegenüber ansonsten NK-Zell-resistenten Tumorzellen gesteigert [Liu et al., 2021].

Das Ausmaß der CAR-vermittelten Stimulierung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dabei ist unter anderem die Wahl der geeigneten Signaldomänen entscheidend. Präklinische und klinische Studien deuten darauf hin, dass die Verwendung von CARs der zweiten Generation zu einer gesteigerten Effektorfunktion modifizierter Zellen führt [Maher et al., 2002; Imai et al., 2004]. Bei CD19- und GD₂-spezifischen CAR-NK-Zellen, deren Signaldomäne zusätzlich zu CD3ζ auch 4-1BB oder 2B4 enthält, zeigte sich eine erhöhte Zytotoxizität und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine [Imai et al., 2005; Altvater et al., 2009]. In einer Studie zur Behandlung von Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem B-NHL (*B cell Non-Hodgkin's Lymphoma*) mit autologen, CD19-spezifischen

CAR-T-Zellen wiesen CAR-Effektorzellen der zweiten Generation, welche als ko-stimulatorische Domäne CD28 enthielten, eine höhere Proliferation und Langlebigkeit als CAR-T-Zellen der ersten Generation auf [Savoldo et al., 2011]. In einem direkten Vergleich der CD28- und 4-1BB-Signaldomäne CD19-spezifischer CARs führte die CD28-Domäne zur Entwicklung CD8-positiver Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM} , *Effector memory T cells*), während die 4-1BB-Domäne die Proliferation zentraler T-Gedächtniszellen (T_{CM} , *Central memory T cells*) förderte [Kawalekar et al., 2016]. Die Integration bestimmter ko-stimulatorischer Domänen kann jedoch auch einen negativen Effekt auf die Aktivität CAR-modifizierter Effektorzellen haben. So wurde bei einigen CAR-T-Zellprodukten eine erhöhte Aktivität auch in Abwesenheit des Zielantigens beobachtet, was als *Tonic signaling* bezeichnet wird [Long et al., 2015; Gomes-Silva et al., 2017]. Dieser Effekt könnte auch bei CAR-NK-Zellen auftreten, bei denen eine erhöhte Aktivierung durch die Dimerisierung von CAR-Konstrukten mit aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren in Abwesenheit des Zielantigens möglich erscheint [Laskowski et al., 2022]. Des Weiteren sind sterische Effekte bei der Interaktion von CAR und entsprechendem Zielantigen von entscheidender Bedeutung. Diese werden unter anderem durch Lokalisierung des Epitops im Zielantigen und die Länge der *hinge*-Domäne beeinflusst. Eine schwächere Bindung von CAR-Effektorzellen an Zielzellen, unter anderem aufgrund einer größeren Distanz zwischen der Antigen-Bindestelle und der Tumorzellmembran, ist mit einer geringeren CAR-induzierten Aktivierung assoziiert und kann das Risiko einer *on-target/off-tumor*-Toxizität reduzieren [Sadelain et al., 2013].

Der Einsatz CAR-modifizierter Effektorzellen in der Krebsimmuntherapie geht mit einigen Herausforderungen einher. Diese umfassen die in Folge von *Escape*-Mechanismen induzierte Herunterregulierung der Zielantigene sowie die Ausbildung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus [Martinez und Moon, 2019]. Um diesen Herausforderungen in der CAR-Therapie entgegenzuwirken, wurden weitere Optimierungsstrategien entwickelt. Diese beinhalten beispielsweise bi-spezifische CAR-modifizierte Immunzellen, welche entweder mit einem bicistronischen Transfervektor, kodierend für zwei CAR-Konstrukte (duale CARs), oder Tandem CARs mit zwei verschiedenen scFv-Domänen innerhalb eines CAR-Moleküls modifiziert werden (siehe Abb. 1.3, A und B) [Schneider et al., 2017; Chen et al., 2018]. Auch kann in CAR-Effektorzellen durch entsprechende Modifikation eine Unempfindlichkeit gegenüber immunsupprimierenden Zytokinen wie TGF- β erzielt werden (siehe Abb. 1.3, C) [Chaudhry et al., 2022]. Ein weiterer Ansatz ist das Einbringen zusätzlicher Transgene, welche die Expression immunstimulatorischer Proteine vermitteln. Diese ermöglichen zum einen die parakrine Stimulierung umgebender Immunzellen, zum anderen sind sie in der Lage, autokrin auf die CAR-Effektorzellen selbst zu wirken. Derartig modifizierte CARs der vierten Generation werden im Fall von CAR-T-Zellen als *armored* CARs oder

TRUCKS (*T cells redirected for universal cytokine killing*) bezeichnet (siehe Abb. 1.3, D) [Chmielewski und Abken, 2015].

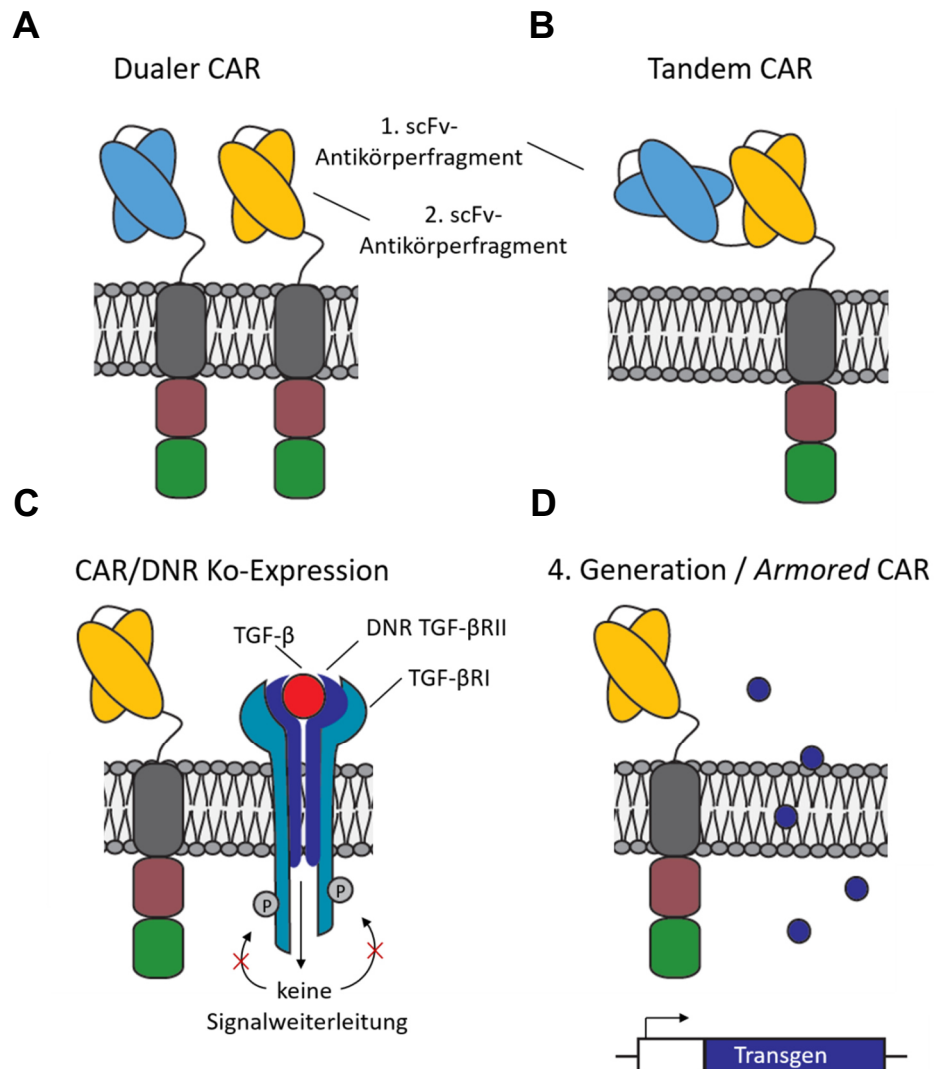


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus optimierter CAR-Varianten. Die Modifizierung von Effektorzellen mit bispezifischen CARs ermöglicht die Erkennung zweier unterschiedlicher Zielantigene. Dies wirkt der auf soliden Tumoren oftmals beobachteten heterogenen Expression und Herunterregulierung von Antigenen entgegen. **(A)** Duale CARs definieren sich durch die Ko-Expression zweier CARs mit verschiedenen scFv-Antikörperfragmenten auf derselben Effektorzelle, während **(B)** Tandem CARs zwei verschiedene scFv-Antikörperfragmente innerhalb eines CAR-Konstrukts enthalten. **(C)** Zur Erhaltung der Antitumoraktivität modifizierter CAR-Effektorzellen in Gegenwart des immunsuppressiven Zytokins TGF-β können diese zugleich mit einem TGF-β *dominant-negative TGF-β receptor II* (DNRII) modifiziert werden. Diesem fehlt die Kinase-Domäne, wodurch nach Ligandenbindung die Phosphorylierung des TGF-βRI und anschließende Signalweiterleitung ausbleibt. **(D)** Daneben wurden CARs der 4. Generation entwickelt, sogenannte *armored* CARs. Durch Einbringen weiterer Transgene sind solche CAR-modifizierten Effektorzellen in der Lage, immunstimulatorische Proteine wie Zytokine zu sekretieren. Diese können zum einen autokrin auf die produzierenden Zellen selbst und zum anderen auf umgebende Immunzellen wirken.

Auch CAR-NK-Zellen können in solcher Weise modifiziert werden, dass sie in der Lage sind, im Tumorgewebe pro-inflammatorische Zytokine entweder konstitutiv oder nach Aktivierung durch

Antigenbindung zu sekretieren [Sahm et al., 2012]. Dies soll das Überleben der Effektorzellen ermöglichen und eine nachfolgende endogene Immunreaktion gegen den Tumor unterstützen.

In einer CAR-NK-Zell-Studie zur Behandlung rezidivierender oder refraktärer B-Zell lymphoider Tumoren wurden Spender-NK-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert und mit einem bicistronischen retroviralen Vektor, kodierend für einen CD19-spezifischen CAR und IL-15 zur Steigerung der Expansion und Langlebigkeit transduziert (NCT03056339). Das Konstrukt enthielt zusätzlich die induzierbare Caspase 9 (iCas9), durch deren gezielte Aktivierung mit einem *Dimerizer* bei auftretenden Toxizitäten die Apoptose der CAR-NK-Zellen eingeleitet werden kann. Die ersten Ergebnisse der Phase I/II-Studie zeigten ein deutlich verlängertes Überleben der IL-15-exprimierenden CAR-NK-Zellen ohne schwerwiegende Toxizitäten [Liu et al., 2020]. Trotz dieser Fortschritte erfordern Gewinnung, Expansion und Erhaltung primärer NK-Zellen weiterhin einen großen finanziellen und personellen Aufwand. Eine mögliche Alternative zu primären NK-Zellen sind daher immortalisierte Zelllinien, welche ebenfalls als *off-the-shelf*-Produkt in der adoptiven Krebsimmuntherapie eingesetzt werden können [Zhang et al., 2017].

1.3.4 Die NK-Zelllinie NK-92

NK-92 ist eine kontinuierlich proliferierende NK-Zelllinie, welche aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten isoliert wurde. Wachstum und Zytotoxizität von NK-92 sind wie bei allen NK-Zellen von IL-2 abhängig [Gong et al., 1994]. Des Weiteren ist der Immunphänotyp von NK-92 mit dem aktivierter primärer NK-Zellen vergleichbar. NK-92-Zellen weisen eine erhöhte Oberflächenexpression vieler aktivierender Rezeptoren wie NKp30, NKp46 und NKG2D auf, während sich die Expression inhibitorischer Rezeptoren auf KIR2DL4 und NKG2A beschränkt. Daher besitzen sie eine hohe intrinsische Zytotoxizität gegenüber diversen hämatopoetischen und soliden Tumorerkrankungen [Maki et al., 2001]. Aufgrund der fehlenden CD16-Expression sind sie jedoch nicht in der Lage, ADCC zu induzieren [Gong et al., 1994]. Die Antitumoraktivität von NK-92-Zellen wird zum einen über zytotoxische Granula vermittelt, zum anderen ermöglicht die Expression von TNF α , FasL und TRAIL die Einleitung der Apoptose über Todesrezeptoren [Maki et al., 2001]. NK-92-Zellen werden vor Infusion in Patienten mit 10 Gy bestrahlt, um die mögliche Bildung eines sekundären Lymphoms zu verhindern. Die Bestrahlung hat keinen negativen Effekt auf die Zytotoxizität von NK-92, verringert jedoch deren Lebensdauer auf wenige Tage [Klingemann et al., 1996]. Die Sicherheit und Verträglichkeit bestrahlter NK-92-Zellen wurde in Phase I Studien zur Behandlung diverser Tumorerkrankungen bestätigt, bei denen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt werden konnten [Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013]. Eine mögliche Alternative zur Bestrahlung stellt die Modifizierung mit einem *Suicide*-Gen wie iCas9

dar, welches bei auftretender Toxizität aktiviert werden und zu einer schnellen Eliminierung der modifizierten NK-Zellen führen kann. Im Vergleich zur Bestrahlung führt die Verwendung eines *Suicide*-Gens nicht zu einer Beeinflussung der Lebensdauer der NK-92-Zellen und könnte so eine Verringerung der Zelldosis und Reduktion der Zahl an Behandlungen während der therapeutischen Anwendung erlauben [Oelsner et al., 2019]. NK-92 gilt als die am intensivsten untersuchte NK-Zelllinie und wird im Rahmen einer CAR-Therapie bereits klinisch eingesetzt [Zhang et al., 2017; Kloess et al., 2019]. Die unter maßgeblicher Beteiligung unserer Arbeitsgruppe initiierte Phase I Studie CAR2BRAIN (NCT03383978) ist die erste und bislang einzige Studie mit CAR-NK-92-Zellen in Europa. Dabei wird die ErbB2-spezifische CAR-NK-92-Zelllinie NK-92/5.28.z zur Behandlung von Glioblastom-Patienten eingesetzt [Schönfeld et al., 2015; Nowakowska et al., 2018; Burger et al., 2019].

1.4 Das Disialogangliosid GD₂ als Zielantigen für die Krebsimmuntherapie

1.4.1 Bedeutung von GD₂ in der Tumorentwicklung

Das Disialogangliosid GD₂ ist ein Sialinsäure-tragendes Glykosphingolipid, welches zu den b-Serien-Gangliosiden gehört und durch die GD₂-/GD₃-Synthase aus Vorläufer-Gangliosiden generiert wird (siehe Abb. 1.4, A). Nach der intrazellulären Bildung erfolgen die Translokation von GD₂ zur Plasmamembran und seine anschließende Anordnung in *Lipid rafts*. Das hydrophobe Ceramid ist dabei in der äußeren Plasmamembran verankert, der hydrophile Monosaccharid-Anteil hingegen befindet sich im extrazellulären Bereich (siehe Abb. 1.4, B) [Schnaar et al., 2009].

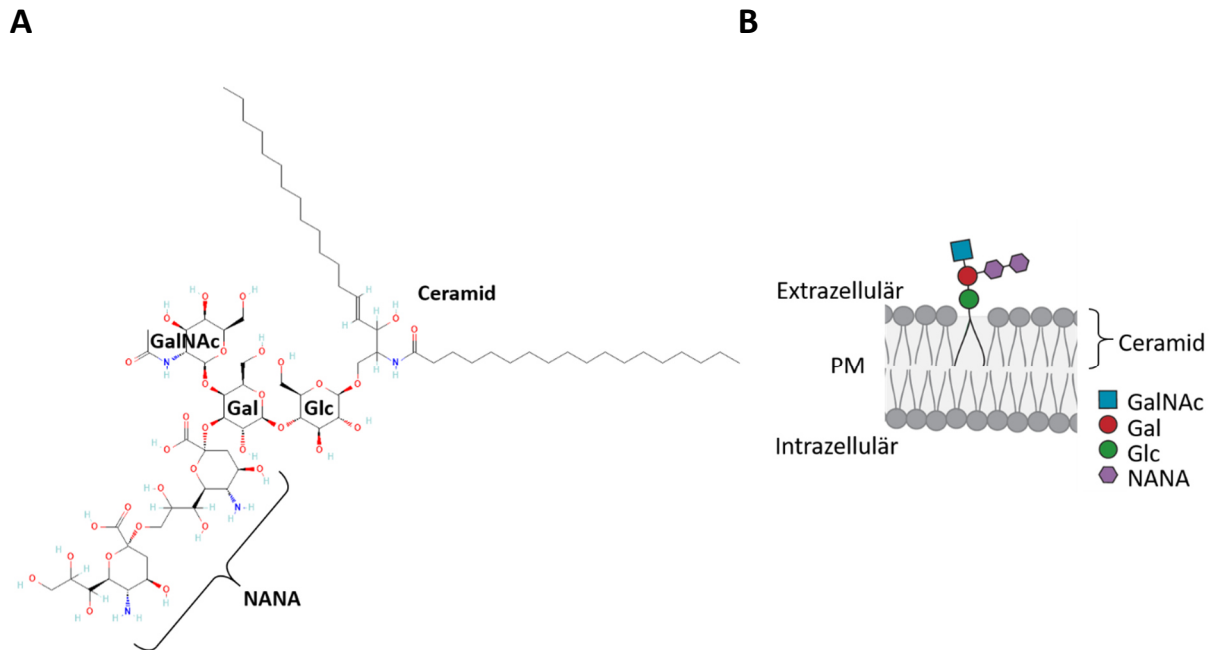


Abbildung 1.4: Disialogangliosid GD₂. (A) Chemische Struktur von GD₂. GD₂ besteht aus einem Ceramid, an welches 5 Monosaccharide gebunden sind: Glukose (*Glucose*, Glc), Galactose (Gal), N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und N-Acetylneuraminsäure (*N-acetylneuraminic acid*, NANA) = Sialinsäure (modifiziert nach [Nazha et al., 2020]). (B) Lokalisierung von GD₂. Nach intrazellulärer Bildung erfolgt der Transport von GD₂ über Vesikel an die Plasmamembran (PM). Dort ist es mit dem hydrophoben Ceramid in der äußeren PM verankert, während der hydrophile Oligosaccharid-Anteil in den extrazellulären Raum ragt.

Im gesunden Gewebe liegt GD₂ nur in geringem Maß vor, wobei es hauptsächlich im zentralen Nervensystem, auf peripheren Nerven, dermalen Melanozyten und mesenchymalen Stromazellen (*Mesenchymal stromal cells*, MSCs) lokalisiert ist [Lammie et al., 1993; Jin et al., 2010]. In einer Vielzahl von Tumoren wie beispielsweise Sarkomen oder in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs zeigt sich jedoch eine erhöhte Expression des Gangliosids [Navid et al., 2010]. Eine anomale Glykosylierung von Proteinen und Lipiden stellt ein Merkmal von Krebs dar und trägt entscheidend zu pathophysiologischen Prozessen während der Tumorentwicklung bei [Hakomori, 1994]. Im Rahmen der Kanzerogenese spielt GD₂ eine bedeutende Rolle für die Proliferation und Invasivität von Tumorzellen und ist dadurch mit einer schlechteren Prognose assoziiert [Nazha et al., 2020]. Zugrunde liegende Mechanismen sind hierbei die Überexpression von GD₂ sowie seine Abspaltung (*Shedding*) und Sekretion in das Tumormikromilieu. So wurde in Retinoblastom- und Neuroblastom-Patienten eine positive Korrelation zwischen Tumorprogression und der GD₂-Konzentration im Serum festgestellt [Wu et al., 1987; Portoukalian et al., 1993]. Dies kann zum einen zur Inhibierung der antitumoralen Immunantwort beitragen. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Interaktion von zirkulierendem GD₂ mit der Thrombozytenmembran zur Clusterbildung des Rezeptors $\alpha 2\beta 1$ Integrin führt. Dessen anschließende Bindung von Kollagen induziert diverse Signalkaskaden wie die Aktivierung von FAK (*Focal adhesion kinase*), welche die Metastasierung, die Aggregatbildung

zwischen Thrombozyten und Tumorzellen sowie die Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix stimulieren können [Valentino und Ladisch, 1994; Chen et al., 2013]. Aufgrund seiner tumorspezifischen Expression gilt GD₂ als tumorassoziiertes Antigen (TAA) und als attraktives Zielantigen für die Krebsimmuntherapie. Laut *U.S. National Cancer Institute* liegt GD₂ auf dem 12. Platz von 75 möglichen Zielantigenen in der Krebstherapie, unter anderem basierend auf seiner Onkogenität, dem Expressionsniveau auf Antigen-positiven Zellen, der Anzahl von Patienten mit Antigen-positiven Tumoren und der Lokalisation des Antigens auf der Zellmembran [Cheever et al., 2009].

1.4.2 GD₂-überexprimierende Tumoren

GD₂ findet sich hauptsächlich auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wie dem Neuroblastom, Melanom oder Retinoblastom und ist variabel in anderen Tumoren wie dem Sarkom, dem kleinzelligen Lungenkarzinom (*Small cell lung cancer*, SCLC), dem Gliom und auf Brustkrebs-Stammzellen (*Breast cancer stem-like cells*, BCSC) exprimiert [Nazha et al., 2020]. Das Neuroblastom (NB) stellt mit einer Inzidenz von 12,4 pro 1 Mio. Einwohner den häufigsten, extrakraniellen soliden Tumor im Kindesalter in Deutschland dar, wobei das mediane Alter bei Diagnosestellung 18 Monate beträgt [Okawa und Saika, 2022]. Dessen Entwicklung erfolgt aus undifferenzierten Zellen, welche aus der Neuralleiste des sympathischen Nervensystems stammen. Primärtumoren des NB befinden sich zumeist beidseitig der Wirbelsäule, an Nebennieren und im Abdomen [Brodeur, 2003]. Frühe Stadien definieren sich durch einen lokoregionalen Tumor mit oftmals spontaner Rückbildung und sind im Allgemeinen gut therapiebar. Sie weisen ein 5-Jahres-EFS (*Event-free survival*) von über 90 % auf [Hero et al., 2008; Pinto et al., 2015]. In späten Stadien, von welchen zumeist Patienten im Alter von mehr als 18 Monaten betroffen sind, treten zudem Metastasen im Knochenmark, in Lymphknoten, Leber und Haut auf. Trotz eines multimodalen Therapiekonzepts ist dabei das 5-Jahres-EFS auf etwa 50 % reduziert [Pinto et al., 2015]. Das Neuroblastom ist eine heterogene Malignität mit einer Vielzahl genetischer Anomalien, welche den Krankheitsverlauf beeinflussen [Seeger et al., 1985; Valentijn et al., 2015; Attiyeh et al., 2005; Eleveld et al., 2015]. Die optimale Behandlungsstrategie ergibt sich aus der Einschätzung des Krankheitsstadiums nach der INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*)-Klassifikation [Monclair et al., 2009]. Die Standardtherapie besteht aus mehreren Behandlungsblöcken und umfasst bei Hochrisiko-Patienten aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer minimalen Resterkrankung (*Minimal residual disease*, MRD) zusätzlich eine Erhaltungstherapie. Diese besteht standardmäßig aus der Gabe des Vitamin A-Derivats 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin), welches sowohl die Proliferation von Neuroblastomzellen hemmt wie auch deren Differenzierung stimuliert [Smith und Foster, 2018; Abemayor, 1992].

GD₂ gilt sowohl in humanen Neuroblastomzelllinien wie auch bei primären Neuroblastomen als häufigstes Gangliosid [Wu et al., 1986]. In klinischen Studien zeigte sich, dass während der Erhaltungsphase der Behandlung die Kombination aus einer GD₂-spezifischen Immuntherapie und Isotretinoin zu einem verbesserten EFS und *Overall survival* (OS) führt (NCT00026312) [Yu et al., 2010]. Eine erhöhte GD₂-Expression wurde zudem in annähernd 60 % der untersuchten Tumoren von Brustkrebs-Patientinnen festgestellt, wobei die Mehrheit aggressive Subtypen wie *Triple-negative breast cancer* (TNBC) oder das metaplastische Mammakarzinom aufwies [Orsi et al., 2017]. Hierbei konnte GD₂ auf der Oberfläche eines Großteils von CD44^{hi}CD24^{lo}-Zellen nachgewiesen werden, welche als BCSC-Subpopulation definiert und sowohl mit gesteigerter Invasivität als auch Metastasierung assoziiert sind [Battula et al., 2012]. Aufgrund dieses Zusammenhangs gilt GD₂ auch als relevanter Marker für Brustkrebszellen mit Stammzellcharakter.

1.4.3 Entwicklung GD₂-spezifischer Immuntherapien

Komplexe Kohlenhydratantigene wie GD₂ gehören der Gruppe der sogenannten T-Zell-unabhängigen (*T cell-independent*, TI) Antigene der Kategorie 2 (TI-2) an. Die repetitive Struktur der TI-2-Antigene induziert die Aktivierung von B-Zellen nicht mittels der MHC II-abhängigen Stimulierung durch T-Helferzellen, sondern direkt durch die Kreuzvernetzung mehrerer B-Zell-Rezeptoren (*B cell receptor*, BCR). Dies führt zur Differenzierung zu Plasmazellen und der anschließenden Produktion von hauptsächlich niedrig affinen IgM-Antikörpern mit geringer Halbwertszeit [Mosier und Subbarao, 1982; Mond et al., 1995]. Wird GD₂ durch Tumorzellen oder als Vakzin präsentiert, kommt es aufgrund seiner geringen Immunogenität und der fehlenden Beteiligung von T-Helferzellen lediglich zu einer kurzlebigen IgM-Antwort mit niedrigem Titer und schwachem Immungedächtnis [Wondimu et al., 2008].

Vakzine

Eine Vakzinierung mit Proteinen oder Peptiden kann durch die effektive Aktivierung der humoralen und T-Zell-vermittelten Immunantworten die begrenzte Immunogenität von Kohlenhydratstrukturen überwinden [Basak et al., 2003]. Einen Ansatz, das Antigen GD₂ in einer Protein-Struktur nachzubilden, stellt die Generierung des anti-idiotypischen Antikörpers Ganglidiomab dar, dessen Paratop GD₂ nachahmt und somit die Bildung anti-anti-idiotypischer Antikörper induziert, welche mit dem ursprünglichen TAA kreuzreagieren [Lode et al., 2013]. Die Generierung von Ganglidiomab erfolgte durch die Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit dem murinen, IgG2a-basierten GD₂-Antikörper 14.G2a. Die anschließende Vakzinierung von A/J-Mäusen mit Ganglidiomab zeigte eine deutliche Steigerung der humoralen Antwort gegen GD₂ [Lode et al., 2013]. Des Weiteren wurden bi-

und trivalente Ganglioside in Kombination mit Adjuvantien untersucht. So wurde in einer randomisierten Phase II-Studie in Patienten mit metastatischem Sarkom ein trivalentes, KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*)-konjugiertes Gangliosid-Vakzin, bestehend aus GM₂, GD₂ und GD₃, in Kombination mit dem Adjuvans OPT-821 eingesetzt (NCT01141491) [Rosenbaum et al., 2022]. Aufgrund der mit der subkutanen Injektion von OPT-821 einhergehenden Nebenwirkungen wie Hautrötungen wurde auch eine Kontrollgruppe nur mit dem Adjuvans behandelt. Im Vergleich zu der alleinigen Gabe von OPT-821 konnte eine gesteigerte serologische Immunantwort gegen die Ganglioside festgestellt werden. Jedoch zeigte sich kein Unterschied im RFS (*Relapse-free survival*) beziehungsweise OS. In einer weiteren randomisierten Phase I/II-Studie wurden Hochrisiko-Neuroblastom-Patienten mit einem bivalenten, KLH-konjugierten GD₂-/GD₃-Vakzin und OPT-821 immunisiert (NCT00911560) [Cheung et al., 2021]. Die zusätzliche orale Gabe von β -Glukan führte dabei zu einer erhöhten humoralen Immunantwort, welche jedoch mit Ausnahme von Patienten mit einem anti-GD₂-IgG1-Titer im Serum von mehr als 150 ng/ml weder PFS (*Progression-free survival*) noch OS begünstigte [Cheung et al., 2021].

Monoklonale Antikörper

Die aktive Immuntherapie gilt im Hinblick auf die Langzeit-Immunität als bevorzugte Behandlungsstrategie. Da jedoch betroffene Patienten aufgrund vorangegangener Therapien häufig immunsupprimiert sind, stellt die passive Immunisierung mit GD₂-spezifischen Antikörpern gegebenenfalls die bessere Alternative dar. Die Tumorzelllyse kann hierbei über vier unterschiedliche Mechanismen (*Mechanisms of action*, MOA) eingeleitet werden, die im Folgenden kurz erläutert werden [Nazha et al., 2020]. (1) ADCC beziehungsweise ADCP (*Antibody-dependent cellular cytotoxicity/phagocytosis*) wird durch NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile oder Eosinophile vermittelt [Navid et al., 2010; Tay et al., 2019]. (2) CDC (*Complement-dependent cytotoxicity*) wird nach Opsonierung der Tumorzellen durch die Aktivierung des Komplementsystems initiiert [Golay und Taylor, 2020; Ragupathi et al., 2005]. (3) Auch eine direkte Initiierung des Zelltods durch Bindung GD₂-spezifischer Antikörper an Zielantigen-exprimierende Tumorzellen ohne die Beteiligung des Immunsystems ist möglich [Nazha et al., 2020]. (4) Zudem kann die kompetitive Bindung GD₂-spezifischer Antikörper an Tumorzellen der Interaktion zirkulierender Krebszellen mit Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix und somit deren Metastasierung entgegenwirken [Cheresh et al., 1986]. Mögliche Hürden bei der Entwicklung derartiger Antikörper können zum einen eine zu geringe Bindungsaffinität beziehungsweise bei intakten IgG-Molekülen eine reduzierte Tumorpenetration und folglich eine unzureichende Wirkung sein [Ahmed und Cheung, 2014]. Zum anderen besteht durch die Bindung an GD₂-exprimierendes, gesundes Gewebe wie die peripheren Nerven das Risiko einer akuten *on-target/off-tumor*-Toxizität, welche sich in Symptomen wie

Schmerzen, Fieber und Nesselausschlag äußert [Navid et al., 2010]. Im Lauf der Zeit wurde eine Vielzahl monoklonaler Antikörper (mAb) für die GD₂-spezifische Immuntherapie entwickelt, wobei zwischen murinen, chimären und humanisierten Varianten unterschieden wird (siehe Abb. 1.5).

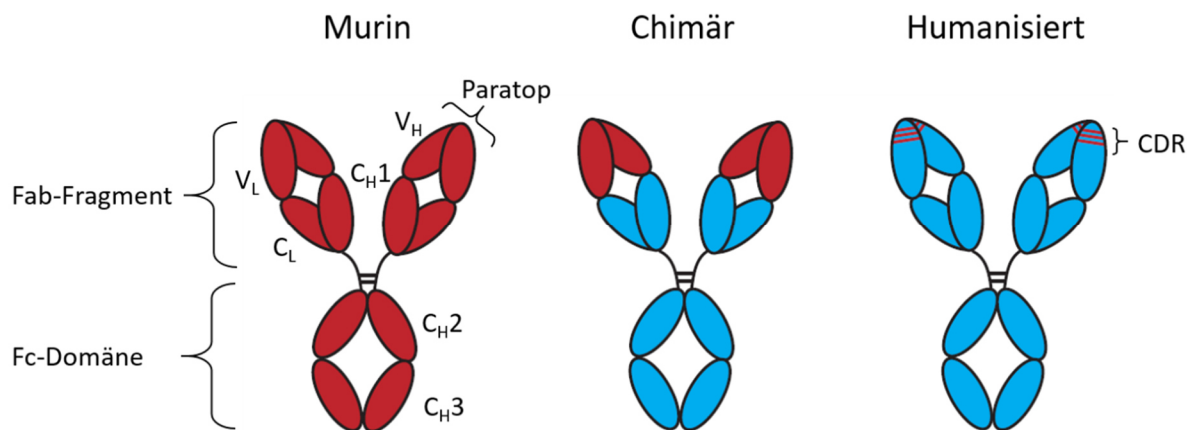


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Varianten GD₂-spezifischer Antikörper. GD₂-spezifische Antikörper sind Immunglobuline der Klasse G (IgG), welche aus je zwei leichten (*Light*, L) und schweren (*Heavy*, H) Peptidketten bestehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der Antigen-bindende Teil (*Fragment antigen binding*, Fab) enthält die variablen Domänen V_H und V_L und die konstanten Domänen C_H1 und C_L. Innerhalb der variablen Domänen befinden sich jeweils drei hypervariable Regionen (*Complementarity-determining regions*, CDRs), welche das Paratop bilden. Der Fc-Teil (*Fragment crystallizable*), bestehend aus den konstanten Domänen C_H2 und C_H3, ist über eine flexible *hinge*-Region mit dem Fab-Fragment verbunden [Schroeder Jr und Cavacini, 2010]. Die ersten therapeutischen Antikörper zur Behandlung GD₂-positiver Tumoren waren murinen Ursprungs (rot). Chimäre Antikörper bestehen hingegen aus murinen variablen und humanen (blau) konstanten Domänen. Die Komponenten vollständig humanisierter Antikörper sind größtenteils humanen Ursprungs. Lediglich die CDRs entstammen noch dem ursprünglichen murinen Antikörper.

Während bei murinen mAbs alle Komponenten aus der Maus stammen, sind chimäre Antikörper aus murinen variablen Regionen und humanen konstanten Domänen zusammengesetzt. Humanisierte mAbs hingegen bestehen aus einem vollständig humanen IgG-Molekül, dessen Antigen-bindende Domäne jedoch noch murine *Complementarity-determining regions* (CDR)-Sequenzen enthält [Navid et al., 2010]. Der erste klinisch eingesetzte GD₂-spezifische Antikörper war der murine, IgG3-basierte mAb 3F8, welcher 1985 mittels Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit humanen Neuroblastom-Zellen generiert wurde [Cheung et al., 1985]. Zwei Jahre später wurde dieser erstmals in einer Phase I Studie zur Behandlung von Neuroblastom (NB)- und Melanom (Mel)-Patienten eingesetzt, wobei jeweils zwei Patienten bei Therapieende eine CR (*Complete response*) (NB) beziehungsweise PR (*Partial response*) (Mel) aufwiesen [Cheung et al., 1987]. Zusätzlich zu auftretenden Nebenwirkungen, welche auf einen *on-target/off-tumor*-Effekt zurückzuführen waren, wurden in den

Seren aller Patienten *Human anti-mouse antibodies* (HAMAs) nachgewiesen. Bei erhöhter Konzentration dieser HAMAs (> 1000 U/ml) konnte kein Behandlungserfolg mehr festgestellt werden, was sich durch die kompetitive Hemmung des GD₂-spezifischen murinen mAb erklären lässt. Um der Bildung derartiger neutralisierender Antikörper-Komplexe entgegenzuwirken, wurden chimäre und humanisierte mAbs entwickelt. Neben der geringeren Immunogenität weisen diese, verglichen mit murinen mAbs mit einer *in vivo* Halbwertszeit von weniger als 20 h, eine höhere Halbwertszeit von bis zu drei Wochen auf [Glennie und Johnson, 2000]. Dies führt wiederum zu einer stärkeren Aktivierung der zellulären und humoralen Immunantworten gegen Antikörper-opsonierte Zielzellen. Beispiele hierfür sind der chimäre mAb ch14.18 und der humanisierte mAb hu14.18, welche aus dem murinen, IgG2a-basierten mAb 14.G2A generiert wurden [Gillies et al., 1989]. 14.G2A, eine Variante des murinen mAbs 14.18, weist mit einem K_D von 77 nM eine niedrigere Bindungsaffinität als 3F8 ($K_D = 5$ nM) auf [Mujoo et al., 1989; Cheung et al., 2012]. Der IgG1-basierte mAb ch14.18 (Dinutuximab) wurde 2015 von FDA und EMA unter dem Markennamen Unituxin® zur Behandlung des Hochrisiko-Neuroblastoms in pädiatrischen Patienten, welche eine PR nach multimodaler Therapie aufweisen, zugelassen. Dies basierte auf einer randomisierten Phase III Studie (*Children's Oncology Group* (COG)-Studie ANBL0032).

Unituxin® wurde in Kombination mit GM-CSF und IL-2 zur Aktivierung von ADCC sowie Isotretinoin verabreicht und zeigte hierbei ein signifikant höheres EFS und OS im Vergleich zu Isotretinoin allein [Yu et al., 2010]. Im weiteren Verlauf der Studie verringerte sich jedoch dieser Unterschied aufgrund einer hohen Rezidivrate [Yu et al., 2021]. Eine Variante namens Dinutuximab beta wurde im Unterschied zu Dinutuximab nicht in der murinen Myelomzelllinie SP2/0 produziert, sondern in *Chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen [Zeng et al., 2005]. Die in CHO-Zellen produzierten Antikörper weisen aufgrund des unterschiedlichen Glykosylierungsmusters einen geringeren Anteil an N-Glycolylneuraminsäure auf, welche im menschlichen Organismus nicht vorkommt, und bergen somit ein reduziertes Risiko der Ausbildung entsprechender Xeno-Autoantikörper. Ansonsten ist das Sicherheitsprofil von ch14.18/CHO mit dem von ch14.18/SP2/0 vergleichbar [Ladenstein et al., 2013]. Auf Basis zweier Studien der *International Society Of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Group* (SIOPEN) wurde Dinutuximab beta 2017 von der EMA unter dem Handelsnamen Qarziba® zugelassen [Ladenstein et al., 2018; Ladenstein et al., 2019]. Grundlage hierfür war, dass durch die Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastompatienten im Rahmen der Erhaltungstherapie beziehungsweise von Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem Neuroblastom mit Qarziba® in Kombination mit Isotretinoin ein erhöhtes Überleben erreicht werden konnte [Wieczorek et al., 2022]. Jedoch traten bei zusätzlicher subkutaner Gabe von IL-2 vermehrt Toxizitäten wie Schmerzen oder das Kapillarlecksyndrom auf. Im Jahr 2020 ließ die FDA dann in einem beschleunigten Verfahren

den humanisierten, IgG1-basierten Antikörper hu3F8 (Naxitamab, Danyelza®) in Kombination mit GM-CSF zur Behandlung von Patienten im Alter von mindestens einem Jahr mit refraktärem oder rezidivierendem Hochrisiko-Neuroblastom in Knochen oder im Knochenmark zu [Kumar und Gupta, 2022]. Naxitamab weist im Vergleich zu Dinutuximab eine 10-fach höhere Bindungsaffinität für GD₂ beziehungsweise eine gesteigerte CDC-Aktivierung auf. Zudem reduzierte dessen Gabe aufgrund der geringeren Immunogenität das Auftreten von *Human anti-human antibodies* (HAHAs).

Immunzytokine

Zur Reduzierung der systemischen Toxizität und Konzentrierung der Zytokin-Wirkung im Tumorumfeld wurden GD₂-spezifische mAb-Zytokin-Fusionsproteine, sogenannte Immunzytokine, entwickelt. Hierzu zählt unter anderem ch14.18-IL2, welches verglichen mit einer Kombination aus ch14.18 und exogen zugegebenem IL-2 in einem Neuroblastom-*Xenograft*-Modell eine gesteigerte Antitumoraktivität aufwies [Gillies et al., 1992; Pancook et al., 1996]. Ebenso erwies sich das humanisierte Immunzytokin hu14.18-IL2 bei Behandlung von Patienten mit refraktärem und rezidivierendem Neuroblastom beziehungsweise metastasierendem Melanom als vielversprechend [Shusterman et al., 2019; Albertini et al., 2018]. Hierbei zeigte sich der Effekt bei Patienten mit minimaler Resterkrankung, nicht jedoch mit fortgeschrittenen Tumoren. Die hierbei beobachteten Toxizitäten waren zudem mit denen vergleichbar, welche bei der Kombinationstherapie von GD₂-spezifischem Antikörper und löslichem IL-2 auftraten [Shusterman et al., 2010]. Eine Verringerung der IL-2-induzierten Toxizitäten kann unter anderem durch den Einsatz einer mutierten IL-2-Variante erreicht werden (*Low toxicity* IL-2, IL-2LT) [Gillies et al., 2011]. Eine weitere Alternative ist IL-15, welches weder das Kapillarlecksyndrom noch AICD induziert oder Tregs stimuliert, sodass es möglicherweise die bessere Wahl für die Krebsimmuntherapie darstellt [Waldmann et al., 2011]. Beim direkten Vergleich von hu14.18-IL2 und hu14.18-IL15 zeigte sich ein ähnliches Ausmaß an ADCC sowohl in NK-Zell-basierten *in vitro*-Experimenten als auch in *Patient derived xenograft* (PDX)-Mausmodellen, welche T-Zell-depletiert waren, jedoch über funktionale NK-Zellen verfügten [Nguyen et al., 2022]. Im Gegensatz hierzu wurden in immunkompetenten Mäusen nach Behandlung mit hu14.18-IL15 eine geringere Tumoralast und eine erhöhte Überlebensrate festgestellt. Nachfolgende *in vitro* Analysen zeigten eine erhöhte Menge an CD8-positiven Zellen und M1-ähnlichen Tumor-assoziierten Makrophagen (*Tumor associated macrophages*, TAMs) beziehungsweise einen geringeren Anteil an *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) in der Tumorumgebung.

Dennoch haben Behandlungsansätze mit GD₂-spezifischen mAbs nur begrenzten Erfolg. Zum einen scheinen diese bei der Therapie von fortgeschrittenen Tumoren nicht mehr effektiv zu sein. Zum anderen sind etwa 50 % der behandelten Patienten trotz ursprünglichen Ansprechens später von einem Rezidiv betroffen. Mögliche Gründe hierfür können eine unzureichende Tumorpenetration des

Antikörpers beziehungsweise ein aufgrund der vorangegangenen, multimodalen Therapie eingeschränktes Immunsystem sein. Etwa 20 % der Patienten stellen von Anfang an keine geeigneten Kandidaten für eine mAb-basierte Therapie dar, da sie nicht auf die vorausgehende Standard-Induktionstherapie ansprechen [Richards et al., 2018].

CARs

GD₂-spezifische, CAR-modifizierte Effektorzellen sind aufgrund ihrer potenziell höheren Wirksamkeit im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern eine Alternative zur Behandlung fortgeschrittener Tumoren. Die höhere Avidität aufgrund der Expression mehrerer CAR-Moleküle auf einer Zelle und die hierdurch stärkere Bindung an Zielzellen sowie die Kombination aus Tumorspezifität und zytotoxischer Effektorfunktion können zu einer effizienteren Tumorzelllyse führen [Louis et al., 2011]. Der Einsatz von CAR-T-Zellen zur Therapie bestimmter hämatologischer Erkrankungen zeigte bereits großen Erfolg [Ormhøj et al., 2022]. Die Herausforderungen beim Einsatz von CAR-Effektorzellen zur Behandlung solider Tumoren liegen hauptsächlich im immunsupprimierenden Tumormilieu und der ineffektiven Infiltration von CAR-Effektorzellen [Martinez und Moon, 2019]. Daneben wurde bei GD₂-spezifischen CAR-T-Zellen eine begrenzte Langlebigkeit festgestellt, welche unter anderem auf eine konstitutive, Antigen-unabhängige Signalweiterleitung (*Tonic signaling*) zurückgeführt wurde [Long et al., 2015]. Diesem Erschöpfungszustand konnte durch Austausch der ko-stimulatorischen CD28-Domäne durch 4-1BB entgegengewirkt werden. Neben dem Einbau geeigneter ko-stimulatorischer Moleküle zur Verbesserung der Langlebigkeit wurde als weitere Alternative auf Epstein Barr Virus (EBV)-spezifische CTLs als Ausgangszellen zurückgegriffen. Spender-EBV-CTLs wurden Patienten schon zuvor nach allogener Stammzelltransplantation zur Behandlung oder Prävention EBV-assoziiierter Malignitäten verabreicht und wiesen nach adoptivem Transfer eine erhöhte Langlebigkeit auf [Papadopoulos et al., 1994; Rooney et al., 1998]. Dies machte man sich in der CAR-Therapie zunutze. So wurden in einer Phase I Studie zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastom-Patienten autologe EBV-CTLs mit einem 14.G2A-basierten CAR der ersten Generation transduziert, *ex vivo* mit autologen, EBV-modifizierten lymphoblastoiden Zelllinien stimuliert und den Patienten anschließend verabreicht (NCT00085930) [Louis et al., 2011]. Als Vergleich dienten mit CD3-spezifischen Antikörpern aktivierte T-Zellen (*Activated T cells*, ACT), welche mit demselben GD₂-spezifischen CAR modifiziert wurden. Sechs Wochen nach Infusion konnte jedoch kein deutlicher Unterschied in der Anzahl von CAR-CTLs und CAR-ACTs festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich eine Korrelation der Langlebigkeit von CAR-T-Zellen mit dem Anteil an T-Helferzellen beziehungsweise T-Gedächtniszellen. Eine deutliche Verzögerung des Krankheitsverlaufs wurde nur bei Patienten festgestellt, in denen nach sechs Wochen noch CAR-T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Dies verdeutlichte die Notwendigkeit der kontinuierlichen Stimulierung CAR-exprimierender

Effektorzellen [Richards et al., 2018]. Eine mögliche Alternative stellen GD₂-spezifische CAR-Effektorzellen dar, welche durch eine zusätzliche Modifikation immunstimulatorische Zytokine sekretieren, die sowohl in autokriner Weise auf die Produzentenzellen selbst als auch im Tumormilieu auf umgebende Immunzellen wirken. In einer aktuellen Phase I Studie werden zur Behandlung von Kindern mit rezidivierendem oder refraktärem Neuroblastom autologe GD₂-spezifische CAR-NKT-Zellen eingesetzt, welche zugleich IL-15 exprimieren (GINAKIT2, NCT03294954). Diese sind bei gleichzeitigem Ausbleiben Dosis-limitierender Toxizitäten in der Lage, *in vivo* zu proliferieren und Tumoren zu infiltrieren [Heczey et al., 2020]. Im Vergleich zu GD₂-spezifischen, mAb-basierten Immuntherapien wurden in klinischen Studien mit GD₂-spezifischen CAR-Effektorzellen bislang keine *on-target/off-tumor*-Toxizitäten nachgewiesen [Richards et al., 2018]. Dennoch wurden in einigen Studien zur Vermeidung potenzieller Nebeneffekte zusätzlich *Suicide*-Gene wie iCas9 zur möglichen Inaktivierung CAR-modifizierter Zellen eingesetzt (NCT03721068, NCT01822652).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Behandlung solider Tumoren wird oftmals durch ein immunsuppressives Mikromilieu und eine unzureichende Infiltration von Zelltherapeutika erschwert [Martinez und Moon, 2019]. Die hierdurch hervorgerufene Therapieresistenz äußert sich in einer gesteigerten Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen. GD₂ ist ein vielversprechendes Zielantigen solider Krebserkrankungen neuroektodermalen Ursprungs wie dem Neuroblastom und anderer Tumorentitäten wie Brustkrebs [Nazha et al., 2020]. Bisher zeigen Therapieansätze mit GD₂-spezifischen Antikörpern jedoch nur einen mäßigen bis keinen Effekt bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren. Dies führt oftmals zu einem Rezidiv, was größtenteils auf eine durch Therapieresistenz verursachte MRD zurückzuführen ist [Richards et al., 2018]. Eine direkte Verbindung der spezifischen Erkennung GD₂-exprimierender Zielzellen mit der Antitumoraktivität von Effektorzellen stellt einen möglicherweise effektiveren Ansatz dar. Hiervon ausgehend wurden in vorherigen Arbeiten unserer Gruppe NK-92-Zellen mit einem GD₂-spezifischen CAR der ersten Generation modifiziert und *in vitro* erfolgreich gegen diverse Neuroblastom-Zelllinien und primäre Neuroblastomzellen eingesetzt [Esser et al., 2012; Seidel et al., 2015].

Die Effektivität von CAR-Effektorzellen kann durch verschiedene Modifikationen weiter gesteigert werden. So ermöglicht unter anderem die Verwendung von CARs der zweiten Generation eine erhöhte antitumorale Aktivität modifizierter Zellen [Maher et al., 2002; Imai et al., 2004; Savoldo et al., 2011]. Des Weiteren wird der Behandlungserfolg der CAR-Zell-Therapie maßgeblich durch das Tumormikromilieu bestimmt, welches jedoch häufig immunsuppressive Eigenschaften aufweist

[Martinez und Moon, 2019]. In Folge dessen können nicht nur die körpereigenen Immunzellen, sondern auch die CAR-Effektorzellen beeinträchtigt werden. Um möglichen negativen Effekten entgegenzuwirken, wird das Konzept der CAR-Therapie in CARs der 4. Generation durch eine zusätzliche Expression immunstimulierender Zytokine erweitert [Biederstädt und Rezvani, 2021]. Derartige Modifikationen ermöglichen Immuneffektorzellen unter anderem, ihre Proliferation und Effektorfunktion unabhängig von exogenen Stimuli aufrecht zu erhalten [Sahm et al., 2012].

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines verbesserten Therapieansatzes gegen GD₂-exprimierende Tumoren basierend auf CAR-NK-92-Zellen. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen mit einem CAR der zweiten Generation, welcher das scFv-Fragment des humanisierten, GD₂-spezifischen mAb 14.18 (hu14.18) enthält, eingesetzt (NK-92/hu14.18.28.z). Darauf aufbauend wurde parallel ein weiter optimierter Ansatz entwickelt, welcher auf NK-92/hu14.18.28.z-Zellen beruht, die zusätzlich den IL-15-Superagonisten RD-IL15 exprimieren (NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15). Die ektopische Expression von RD-IL15 sollte zum einen die autokrine Stimulierung der CAR-NK-92-Zellen selbst ermöglichen, zum anderen auch parakrin auf umliegende Immunzellen wirken. Neben der Funktionalität des GD₂-spezifischen CARs gegenüber Antigen-exprimierenden Tumorzellen in vergleichenden *in vitro* Analysen wurde daher auch der additive Effekt von RD-IL15 auf die Proliferation und antitumorale Aktivität von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen selbst sowie auf umgebende Immunzellen untersucht. Als weiterer Therapieansatz zur Behandlung GD₂-spezifischer Tumoren wurde zudem ein IgG1-basierter, GD₂-spezifischer scFv-Fc Antikörper entwickelt und dessen Aktivität in Kombination mit CD16a-positiven primären NK-Zellen gegen GD₂-exprimierende Zielzellen ermittelt. In abschließenden *in vivo* Analysen wurde die CAR-vermittelte Zytotoxizität und die immunstimulatorische Wirkung von RD-IL15 in Maus-Tumormodellen untersucht.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Apparaturen

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Apparaturen.

Laborgeräte und Apparaturen	Hersteller
Autoklav	FVS2 + UWK 20.0: Fedegari (Frankfurt am Main)
Bestrahlungsapparatur	Biobeam GM 2000: Gamma Service Medical (Leipzig)
Blotting-Apparatur	Trans-Blot Turbo Transfer System: Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Brutschränke	Zellkultur-Inkubator: Integra Biosciences (Biebertal) Bakterien-Inkubator: Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer	FACSAria Fusion FACSCanto II LSRFortessa } BD Biosciences (Heidelberg)
Elektrophoresekammern	Agarosegele: Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen) SDS-Page: Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Gefrierschränke	-20°C: Liebherr (Biberach) -80°C: New Brunswick/Eppendorf (Hamburg)
Gel-/ Immunoblot-dokumentationssystem	Fusion Fx7: Peqlab (Erlangen)
Heizblock	Techne (Staffordshire, United Kingdom)
<i>In vivo</i> -Dokumentationssystem	IVIS Lumina II: Perkin Elmer (Waltham, USA)
Inkubationsschüttler	Multitron: Infors (Bottmingen, Schweiz)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach)
Magnetrührer	IKA Mag RCT (Staufen)
Mikroskope	Nikon TMS: Nikon (Düsseldorf) Axiovert 25: Zeiss (Oberkochen) CQ1: Yokogawa (Ratingen)
Mikrowelle	Mikromat: AEG (Nürnberg)

Material

Netzgerät	Power Pac 300: Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
PCR-Maschine	Biometra® T3000 Thermocycler RT-PCR: Biometra GmbH (Göttingen) LightCycler® 480: Roche (Basel, Schweiz)
pH-Meter	MP 220: Mettler Toledo (Gießen)
Pipetten	P2, P20, P200, P1000: Gilson (Limburg-Offheim)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu: Integra Biosciences (Biebertal)
Rollenmischer	RM5-30V: CAT/M. Zipperer (Ballrechten-Dottingen)
Spektrophotometer	Evolution 60: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Nanodrop 1000: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) SpectraMax® iD3: Molecular Devices (Wokingham, GBR)
Sterilbank	Zellkultursterilbank: CleanAir by Baker (Utrecht, Niederlande) Bakterien-Sterilbank: Ceag Schirp (Bork)
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2: Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage	Explorer: Ohaus (Greifensee, Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage	Elix: Millipore (Darmstadt)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellzähler	Countess II: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifugen	Avanti™ J-25: Beckmann Coulter (Krefeld) Biofuge pico: Heraeus (Hanau) Megafuge 1.0R: Heraeus (Hanau) Mikro 22R: Hettich (Tuttlingen) Rotina 46 R: Hettich (Tuttlingen) Z 160M: Hermle Labortechnik (Wehingen)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Dialysemembran	Carl Roth (Karlsruhe)
Diverse Kunststoffprodukte	Sarstedt (Nümbrecht), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Corning (Amsterdam, Niederlande), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einmal-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran	Immobilon P: Cytiva (Freiburg)
Protein-G Säule	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sterilfilter (0,45 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)
Whatman Filterpapier	Carl Roth (Karlsruhe)
Zählkammer	KOVA® GLASSTIC® Slide 10: KOVA International (Amsterdam, Niederlande) Countess® Cell Counting Chamber Slides: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ampicillin	InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Calcein Violet AM	Invitrogen (Waltham, USA)
Calciumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
CellTrace™ CFSE	Invitrogen (Waltham, USA)
CellTrace™ Far Red	Invitrogen (Waltham, USA)

Material

Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
eFluor™ 780	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd (4 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc. (Fremont, USA)
Magermilchpulver	Fluka® Analytika (München)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
NucView® 405 Caspase-3 Substrate (in DMSO)	Biotium, Inc. (Fremont, USA)
Polybren	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyethylenglykol 8000	Carl Roth (Karlsruhe)
Polyethylenimin, 25 kDa linear (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12 %	BioRad (Feldkirchen)
TWEEN® 20	Carl Roth (Karlsruhe)
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	Promega (Walldorf)

2.4 Puffer und Lösungen

Wässrige Pufferlösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
CutSmart® Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DNA-Ladepuffer (6x)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DPBS (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>) 1x	Gibco (Waltham, USA)
HBS (<i>Hank's buffered saline</i>) 2x	281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1.5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,12
TBS-T (<i>Tris-buffered saline-Tween 20</i>) 1x	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1 % [v/v] TWEEN 20, pH 7,5
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) 1x	40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 eingestellt mit Eisessig
0,4 % Trypanblau-Lösung	Gibco (Waltham, USA)
0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Waltham, USA)

2.5 Rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden entweder als Lyophilisate geliefert und nach Herstellerangaben entweder in zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) oder in DPBS (1x) mit 0,1 % BSA gelöst oder entsprechend Abschnitt 3.2.3 selbst aufgereinigt.

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete rekombinante Proteine. HRP: *Horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase.

Rekombinantes Protein	Hersteller
His ₆ -RD-IL15	In dieser Arbeitsgruppe generiert (Anne Kiefer, unveröffentlicht). Das rekombinante Protein besteht aus dem IL-15-Superagonisten, welcher an den C-Terminus eines His ₆ -Tags fusioniert ist.
IL-2 (Proleukin® S)	Novartis Pharma GmbH (Nürnberg)

Material

IL-15	PeproTech GmbH (Hamburg)
scFv(Ganglidiomab)-IgG4Fc (Ganglidiomab-Fc)	In dieser Arbeitsgruppe generiert (Dr. Aline Häcker, unveröffentlicht). Der rekombinante Antikörper besteht aus einem 14.18-spezifischen scFv-Antikörperfragment, welches von dem anti-idiotypischen Antikörper Ganglidiomab abgeleitet und über eine von IgG4 abgeleitete <i>hinge</i> -Region an den N-Terminus eines IgG4-Fc Teils fusioniert ist.
scFv(hu14.18)-IgG1Fc (hu14.18-Fc)	In dieser Arbeit generiert. Der rekombinante Antikörper besteht aus einem GD ₂ -spezifischen scFv-Antikörperfragment des humanisierten Antikörpers hu14.18, welches über eine von IgG1 abgeleitete <i>hinge</i> -Region an den N-Terminus eines IgG1-Fc Teils fusioniert ist.
Streptavidin-HRP	GenScript (Piscataway, USA)

2.6 Antikörper

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper. AF: Alexa Fluor, APC: Allophycocyanin, BV: Brilliant™ Violet, Cy7: Cyanin-7, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, PE: Phycoerythrin.

Zielantigen	Klon/ Spezies	Markierung	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Primärantikörper für durchflusszytometrische Analysen:				
CD3 (human)	UCHT1 Maus	APC/Fire 750	BioLegend (Koblenz)	1:400
CD8 (human)	RPA-T8 Maus	APC	BD (Heidelberg)	1:100
CD45RO (human)	UCHL1 Maus	PE-Cy7	BD (Heidelberg)	1:400
CD56 (human)	NCAM16.2 Maus	BV421	BD (Heidelberg)	1:100
CD96 (human)	NK92.39 Maus	PE	Invitrogen (Waltham, USA)	1:400

Material

CD159a/NKG2A (human)	REA110 Mensch	APC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:50
CD197/CCR7 (human)	G043H7 Maus	PE	BioLegend (Koblenz)	1:400
CD223/LAG-3 (human)	7H2C65 Maus	APC	BioLegend (Koblenz)	1:800
CD279/PD-1 (human)	EH12.2H7 Maus	APC-Cy7	BioLegend (Koblenz)	1:1000
CD314/NKG2D (human)	BAT221 Maus	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:400
CD335/NKp46 (human)	9E2 Maus	APC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:200
CD336/NKp44 (human)	p44-8 Maus	AF647	BD (Heidelberg)	1:50
CD337/NKp30 (human)	p30-15 Maus	PE	BD (Heidelberg)	1:400
CD366/TIM-3 (human)	F38-2E2 Maus	APC-Cy7	BioLegend (Koblenz)	1:1000
c-Myc (human)	9E10 Maus	AF647	Invitrogen (Waltham, USA)	1:100
GD ₂ (human)	14G2a Maus	APC	BioLegend (Koblenz)	1:200
GD ₂ (human)	14G2a Maus	PE	BioLegend (Koblenz)	1:200
IL-15 (human)	34559 Maus	-	R&D Systems (Wiesbaden)	1:40
KIR2D (human)	NKVFS1 Maus	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:200
TIGIT (human)	MBSA43 Maus	PE	Invitrogen (Waltham, USA)	1:200
Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Analysen				
Human-IgG	Ziege	APC	Jackson Immuno Research (Ely, GBR)	1:200

Material

Maus-IgG	Ziege	AF647	Invitrogen (Waltham, USA)	1:400
Antikörper verwendet in ELISA				
IL-15 (human)	34593 Maus	-	R&D Systems (Wiesbaden)	1:250
IL-15R α (human)	polyklonal Ziege	Biotin	R&D Systems (Wiesbaden)	1:400
Primärantikörper für Immunoblot-Analysen				
CD8- α (human)	H-160 Kaninchen	-	Santa Cruz	1:500
pSTAT5 (human)	C11C5 Kaninchen	-	Cell Signaling Technology (Leiden, NLD)	1:1000
STAT5 (human)	89/Stat5 Maus	-	BD (Heidelberg)	1:1000
γ -Tubulin (human)	k.A. Kaninchen	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:2000
Sekundärantikörper für Immunoblot-Analysen				
Human-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:16.000
Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:16.000
Maus-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:16.000

2.7 Plasmide

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit generierte und verwendete Plasmide. CMV: Cytomegalievirus, eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*, HIV-1: *Human immunodeficiency virus type 1*, IRES: *Internal ribosome entry site*, P2A: 2A-Peptid des porzinen Teschovirus 1, SFFV: *Spleen focus-forming virus*.

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
pcDNA3-scFv(hu14.18)-IgG1Fc	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches für den GD ₂ -spezifischen Mini-Antikörper hu14.18-Fc unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert.	In dieser Arbeit generiert.
pCMV_ Δ R8.91	Lentivirales Verpackungsplasmid, abgeleitet von HIV-1, welches für Matrix-, Kapsid- und	[Zufferey et al., 1997]

Material

	Nukleokapsidproteine wie auch für die Reverse Transkriptase, Integrase und Polymerase (pol) kodiert.	
pMD2.G	Lentivirales Verpackungsplasmid, welches für das Hüllprotein G des <i>Vesicular stomatitis virus</i> (VSV-G) kodiert.	[Zufferey et al., 1997]
pS-hu14.18.28.z-IEW	Lentivirales Transferplasmid, welches für den GD ₂ -spezifischen CAR hu14.18.28.z kodiert. Die Expression des CARs steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der eGFP cDNA.	Dr. Kurt Schönfeld, unveröffentlicht
pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW	Lentivirales Transferplasmid, kodierend für den GD ₂ -spezifischen CAR hu14.18.28.z, welcher über eine P2A-Sequenz an den N-Terminus des IL-15-Superagonisten fusioniert ist. Die Expression des CARs sowie des Superagonisten steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der eGFP cDNA.	In dieser Arbeit generiert.
pMK-eGFP-P2A-RD-IL15	Klonierungsplasmid von GeneArt; enthält eGFP, welches über eine P2A-Sequenz an den N-Terminus des IL-15-Superagonisten fusioniert ist.	Dr. Aline Häcker, unveröffentlicht
pS-gTM-IEW	Lentivirales Transferplasmid, welches für ein membranständiges Derivat des 14.18-spezifischen, anti-idiotypischen Antikörpers Ganglidiomab unter der Kontrolle des SFFV-Promotors kodiert, gefolgt von einer IRES und der eGFP cDNA.	Dr. Congcong Zhang, unveröffentlicht
pSIEW (pHR'SIN-cPPT-SIEW)	Selbst inaktivierendes lentivirales Transferplasmid, welches für eGFP kodiert. Die Expression von eGFP steht unter Kontrolle des SFFV-Promotors und der IRES-Sequenz.	[Demaison et al., 2002]

pS-luc-GFP-W	Lentivirales Transferplasmid, welches für die <i>Firefly</i> -Luciferase <i>Luc2</i> kodiert. Die Expression der Luciferase steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer T2A-Sequenz und der <i>Superfolder</i> GFP (sfGFP) cDNA.	[Abel et al., 2013]
--------------	--	---------------------

2.8 Oligonukleotide

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz [5'–3']	Orientierung	Verwendung
14.18.28.z GA fwd	GGGGATCTGTATCTGGC GGT	vorwärts	Klonierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert zwischen SFFV-Promotor und Signalpeptid
14.18.28.z GA rv	TTTCAGCAGAGAGAAGT TTGTTGCTCTAGGTGGCA GAGCCTGCA	rückwärts	Klonierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert an CD3ζ und P2A
14.18.28.z_RD-IL15 seq 1	ATAGAGTCCTCCGACAG ACTG	vorwärts	Sequenzierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert an SFFV-Promotor
14.18.28.z_RD-IL15 seq 2	ATAGCTGCAGAAAGACA AGATGG	vorwärts	Sequenzierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert an CD3ζ
14.18.28.z_RD-IL15 seq 3	ATAGGTTGCTCTAGGTG GCAG	rückwärts	Sequenzierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert an CD3ζ und P2A
14.18.28.z_RD-IL15 seq 4	ATAGGACTCGGGTAGGT TAACTG	rückwärts	Sequenzierung von pS-hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert zwischen IL-15-Superagonist und IRES
bGH poly(A) rv	GGCAAACAACAGATGGC TGG	rückwärts	Sequenzierung von Transgenen in pcDNA3-

Material

			Expressionsplasmiden, hybridisiert an BGH- Polyadenylierungssignal
CMV fwd	ATAAGCAGAGCTCTCTG GC	vorwärts	Sequenzierung von Transgenen in pcDNA3- Expressionsplasmiden, hybridisiert an CMV-Promotor
hulgG1 fwd	GCCCCTGAACTGCTGGG CGG	vorwärts	Sequenzierung von pcDNA3- scFv(hu14.18)-IgG1Fc, hybridisiert an IgG1-Fc
hulgG1 rv	GGTCACTTCGGGGGTCC GGC	rückwärts	Sequenzierung von pcDNA3- scFv(hu14.18)-IgG1Fc, hybridisiert an IgG1-Fc
P2A-IL15 GA fwd	GCAACAAACTTCTCTCTG CTGAAA	vorwärts	Klonierung von pS- hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert an P2A
P2A-IL15 GA rv	GGAATACGAACTCGTCA GTTCTT	rückwärts	Klonierung von pS- hu14.18.28.z_RD-IL15-IEW, hybridisiert zwischen IL-15- Superagonist und IRES

2.9 Bakterienstamm

Tabelle 2.9: Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Stbl3	<i>F⁻mcrB mrrhsdS20(r_B⁻, m_B⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ:leumtl-1</i>	Invitrogen (Waltham, USA)

2.10 Bakterienmedien und Antibiotika

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedien und LB-Agar wurden für 20 min bei 121 °C und einem Dampfdruck von 180 – 200 kPa autoklaviert. Nachfolgend wurden die Medien auf etwa 55 °C abgekühlt, bevor Ampicillin in einer 1:1000 – Verdünnung hinzugegeben wurde.

Tabelle 2.10: In dieser Arbeit verwendete Bakterienmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt gelöst in 1 l ddH ₂ O
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin-Agar	LB-Medium 1,5 % [w/v] Agar-Agar 100 µg/ml Ampicillin

2.11 Zellkulturmedien und Zusätze

Das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt. Die nötigen Zellkulturmedien und Zusätze wurden hierfür ebenfalls steril hergestellt und verwendet. Fötales Kälberserum (*Fetal bovine serum*, FBS) wie auch humanes Plasma als Zellkulturzusätze wurden vor Zugabe für 30 min bei 65 °C Hitze-inaktiviert.

Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
DMEM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i> ; Gibco) 10 % [v/v] FBS 2 mM L-Glutamin 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)
Einfriermedium NK-92	10 % [v/v] DMSO in humanem Plasma
Einfriermedium Tumorzellen	10 % [v/v] DMSO in FBS
FBS	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund)
Humanes Plasma	DRK (Deutsches Rotes Kreuz)-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen
IL-2	Proleukin® S (Novartis Pharma GmbH)

Material

IMDM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	IMDM (Iscove's <i>Modified Dulbecco's Medium</i> ; Gibco) 10 % [v/v] FBS 2 mM L-Glutamin 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)
L-Glutamin	Gibco (Waltham, USA)
Opti-MEM	Gibco (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Gibco (Waltham, USA)
RPMI ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	RPMI 1640 (Gibco, Waltham, USA) 10 % [v/v] FBS 2 mM L-Glutamin 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)
X-Vivo ⁺ (mit Zusätzen)	X-Vivo 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5 % [v/v] humanes Plasma
X-Vivo ⁺⁺ (mit Zusätzen)	X-Vivo 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5 % [v/v] humanes Plasma 100 IU/ml IL-2

2.12 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden etablierte humane sowie murine Zelllinien verwendet (Tab. 2.12). Des Weiteren wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), deren Kulturbedingungen im nachfolgenden Methodenteil an entsprechender Stelle näher beschrieben sind, eingesetzt.

Tabelle 2.12: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen.

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz/ ATCC-Nr.
CTLL-2	Murine, zytotoxische T-Zellen	RPMI ⁺⁺⁺ + 50 IU/mL IL-2 + 50 µM β-Mercaptoethanol	TIB-214

Material

EL4	Murines T-Zell-Lymphom	DMEM ⁺⁺⁺	TIB-39
EL4/Luc	Murines T-Zell-Lymphom; exprimiert die <i>Firefly</i> -Luciferase und sfGFP	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
HEK293	Humanes embryonales Nierenzellkarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-1573
HEK293T	Humanes embryonales Nierenzellkarzinom; exprimiert das große T-Antigen des SV40 (<i>Simian virus 40</i>)	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-11268
K562	Humane chronische myeloische Leukämie	RPMI ⁺⁺⁺	CCL-243
MDA-MB453	Humanes Mammakarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	HTB-131
MDA-MB453/gTM	Humanes Mammakarzinom; exprimiert ein membranständiges Derivat des hu14.18-spezifischen, anti-idiotypischen Antikörpers Ganglidiomab	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
NK-92	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom	X-Vivo ⁺⁺	CRL-2407
NK-92/hu14.18.28.z	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den GD ₂ -spezifischen CAR hu14.18.28.z	X-Vivo ⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den GD ₂ -spezifischen CAR hu14.18.28.z und den IL-15-Superagonisten	X-Vivo ⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
Raji	Humanes Burkitt-Lymphom	RPMI ⁺⁺⁺	CCL-86
SK-Mel-23	Humanes Melanom	DMEM ⁺⁺⁺	[Shiku et al., 1976]
UKF-NB3	Humanes Neuroblastom	IMDM ⁺⁺⁺	[Cinatl et al., 1990]

Material

UKF-NB3/Luc	Humanes Neuroblastom; exprimiert die <i>Firefly</i> -Luciferase und sfGFP	IMDM ⁺⁺⁺	Sophia Thevissen (AG Ullrich), unveröffentlicht
-------------	---	---------------------	---

2.13 Mausstamm

Tabelle 2.13: Der in dieser Arbeit verwendete Mausstamm.

Mausstamm	Genotyp	Zucht
NOD- <i>scid</i> IL2R γ ^{null} (NSG)	NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{<i>scid</i>} <i>Il2rg</i> ^{<i>tm1Wjl</i>}	Eigenzucht (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) werden unter Verwendung spezifischer Primer definierte DNA-Sequenzen amplifiziert. Die Reaktionen wurden auf Eis in einem Gesamtvolumen von 50 μl angesetzt und enthielten 1 bis 10 ng der zu amplifizierenden DNA, 1 μl dNTPS (10 mM), jeweils 10 μl des mitgelieferten GC *Enhancers* (5x) und des Q5-Polymerasepuffers (5x), 0,5 μl Q5-Polymerase und je 2,5 μl des *forward*- und *reverse*-Primers (10 μM). Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 50 μl aufgefüllt. Nach Vorheizen der PCR-Maschine auf 95 °C wurde folgendes Programm für die DNA-Amplifizierung durchgeführt:

Tabelle 3.1: PCR-Protokoll unter Verwendung der Q5-Polymerase.

Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		98 °C	30 s
Amplifizierung (30 Zyklen)	Denaturierung	98 °C	10 s
	Hybridisierung	T _H (Primer-spezifisch)	30 s
	Elongation	72 °C	30 s pro kb DNA
Finale Elongation		72 °C	10 min

Die optimale Hybridisierungstemperatur (T_H) wurde mit Hilfe des von New England Biolabs zur Verfügung gestellten Programms *Tm Calculator* bestimmt. Nach erfolgter Amplifizierung wurden die PCR-Produkte bei 4 °C gelagert oder direkt mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.1.3 und 3.1.4).

3.1.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten und Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente werden durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsschnittstellen gespalten. Die Restriktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μl , wobei für 1 μg DNA 1 Unit des entsprechenden Enzyms verwendet wurde. Die Reaktion wurde unter

den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um eine Religation linearisierter Plasmide nach der Restriktion zu verhindern, wurde 30 min vor Ende des Verdau 1 Unit der *Calf intestinal phosphatase* (CIP) (NEB), welche die Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen induziert, zugegeben. Die Reaktion wurde weiterhin bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme Hitze-inaktiviert oder die verdaute DNA wurde direkt über ein Agarosegel aufgetrennt und isoliert (siehe 3.1.3 und 3.1.4).

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Agarosogelen

DNA-Farbstoff	GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Stammlösung: 10.000x in DMSO)
DNA-Größenstandard	100 bp plus DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific) 1 kb plus DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific)

Die Auftrennung von PCR-Produkten sowie verdauten DNA-Fragmenten erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde Agarose in 1xTAE aufgekocht, wobei deren Konzentration zwischen 1 und 1,5 % [w/v] lag und von der erwarteten Größe des zu analysierenden Produkts abhängig war. GelRed® wurde dem Agarosegel als interkalierender DNA-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:10000 zugefügt. Anschließend wurden die DNA-Proben mit DNA-Ladepuffer zu 1/6 des Gesamtvolumens versetzt, neben einem DNA-Größenstandard auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 120 V in 1xTAE als Laufpuffer aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden daraufhin unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

3.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosogelen

Die mit GelRed® angefärbten DNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht detektiert und das Produkt mit der gewünschten Größe wurde mit Hilfe eines sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) aus dem Agarosegel isoliert.

3.1.5 DNA-Ligation

Nach Restriktionsverdau und Gelaufreinigung erfolgte die Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA über spezifische Erkennungsschnittstellen mittels der T4-DNA-Ligase (1 U, NEB). Die Reaktion wurde auf Eis in einem Gesamtvolumen von 20 µl im vom Hersteller empfohlenen Puffer angesetzt. Bis zu jeweils 50 ng Plasmid-DNA und *Insert* wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei sich die einzusetzende Menge wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Plasmid-DNA [ng]} \times \text{Insert [bp]}}{\text{Plasmid-DNA [bp]}} \times \frac{3}{1} = \text{Insert [ng]}$$

Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 4 °C gelagert oder direkt für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet (siehe 3.1.8).

3.1.6 Isothermaler Zusammenbau nach Gibson

Mit Hilfe des isothermalen Zusammenbaus nach Gibson (*Gibson Assembly*) werden zwei oder mehr DNA-Fragmente mit überlappenden DNA-Sequenzen mittels PCR (siehe 3.1.1) unter Verwendung von Überhangprimern amplifiziert und in einem Reaktionsschritt ohne Zuhilfenahme von spezifischen Restriktionsstellen ligiert. Hierfür wurden auf Eis in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach erfolgter DNA-Amplifizierung bis zu jeweils 0,2 pmol Plasmid-DNA und *Insert* in einem molaren Verhältnis von 1:2 mit 10 µl des *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* (2x, NEB) versetzt. Die benötigte DNA-Menge berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{660 \text{ pg}}{\text{pmol}} (\text{ = Molekülmasse eines Basenpaars}) \times \text{DNA [bp]} \times \text{DNA [pmol]} \times \frac{1}{10^3} = \text{DNA [ng]}$$

Die Reaktion erfolgte daraufhin bei einer konstanten Temperatur von 50 °C für 60 min in drei enzymatischen Schritten: die Generierung von überhängenden 3'-Enden durch die 5'-Exonuklease, die Verlängerung der 3'-Enden durch eine DNA-Polymerase und die Ligation. Die Reaktion wurde anschließend bei 4 °C gelagert oder direkt zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien eingesetzt (siehe 3.1.8).

3.1.7 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Transformationspuffer 1	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
	30 mM Kac
	10 mM CaCl ₂
	13 % [v/v] Glycerin
	pH 5,8 eingestellt mit Eisessig, sterilfiltriert
Transformationspuffer 2	75 mM CaCl ₂
	10 mM MOPS (pH 7,0)
	10 mM RbCl
	13 % [v/v] Glycerin

pH 7,0 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert

Die Generierung chemokompetenter Bakterien erfolgte mittels einer LB-Übernachtskultur, welche am Vortag mit einer Einzelkolonie des *E.coli*-Stamms Stbl3 angeimpft wurde. Diese Vorkultur wurde in 600 ml frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C im Schüttler inkubiert, während in regelmäßigen Zeitabständen eine OD (Optische Dichte)-Messung bei 600 nm durchgeführt wurde. Bei Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes von 0,5 wurde die Bakteriensuspension 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 3000 rpm und 4 °C für 15 Minuten pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 200 ml des gekühlten Transformationspuffers 1 resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin ein weiteres Mal bei 3000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 15 ml des Transformationspuffers 2 aufgenommen. Anschließend wurden die chemokompetenten Bakterien aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80 °C für die weitere Verwendung gelagert.

3.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Für die Transformation wurden chemokompetente Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl des rekombinationsdefizienten *E.coli*-Stamms Stbl3 mit 20 ng Plasmid-DNA oder 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension einer Hitzeschock-Behandlung unterzogen und für 45 s einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Daraufhin wurden die kompetenten Zellen für 1 min auf Eis gelagert, mit 300 µl LB-Medium vermischt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Zuletzt wurden die transformierten Bakterien auf LB-Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien wurden Einzelkolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, in LB-Ampicillin-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen nach Herstellerangaben isoliert. Kleinere DNA-Mengen für analytische Folgeexperimente wurden mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) isoliert, wohingegen für die Isolierung größerer DNA-Mengen das NucleoBond® Xtra Maxi Kit (Machery-Nagel) verwendet wurde.

3.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Hierfür wurde 1 µl DNA-Lösung auf den Messplatz des Spektralphotometers gegeben und deren Extinktion bei 260 nm bestimmt. Als Referenz wurde hierbei der für die Lösung der DNA verwendete Puffer hinzugezogen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm definiert die Reinheit der DNA-Lösung, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte.

3.1.11 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der Service von Eurofins Genomics in Anspruch genommen. Hierfür wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 5 µl Plasmid-DNA (80 bis 100 ng/µl) mit 2,5 µl eines sequenzspezifischen Primers (10 µM) versetzt und mit ddH₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend mit einem entsprechenden Barcode markiert und für die Sequenzanalyse verschickt. Die spätere Analyse erfolgte über die Software SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, USA).

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

RIPA (<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>)-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris HCl (pH 7,5) 5 mM EDTA 1 % [v/v] NP-40 0,5 % [w/v] Na-Desoxychelate 0,1 % [w/v] SDS sterilfiltriert
7x Complete Protease-Inhibitor Cocktail	1 Tablette in 1,5 ml RIPA-Puffer
10x PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail	1 Tablette in 1 ml RIPA-Puffer

Für die Extraktion von Proteinen wurden Säugerzellen geerntet (siehe 3.3.1) und zweimal mit DPBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in gekühltem RIPA-Puffer aufgenommen, welcher mit Complete Protease-Inhibitor (Sigma-Aldrich) zu 1/7 sowie PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich) zu 1/10 des Gesamtvolumens versetzt war, wobei für 1×10^6 Zellen 50 µl RIPA-Puffer

verwendet wurden. Die Zellsuspension wurde daraufhin 20 min auf Eis inkubiert und zum Pelletieren von Zelltrümmern für weitere 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im darauffolgenden Schritt wurde das überstehende Zelllysate in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz

Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bradford-Assays bestimmt. Dieser basiert auf dem Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250, welcher mit einer sauren Lösung aus Phosphorsäure und Methanol versetzt ist und über kationische und nicht-polare Seitenketten an Proteine bindet. Die Komplexbildung von im Lysat befindlichen Proteinen und des Farbstoffs führt zu einem Farbumschlag und somit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Lösung von 465 nm auf 595 nm, welches proportional zur Proteinkonzentration zunimmt. Für die Messung wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt, wobei 1 ml in eine Küvette vorgelegt, mit 1 µl des Zelllysats (siehe 3.2.1) beziehungsweise als Referenz 1 µl des Lysepuffers vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Die Messung erfolgte mittels eines Spektrophotometers unter Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes:

$$E_{\lambda}(\text{Extinktion}) = \varepsilon_{\lambda}(\text{Extinktionskoeffizient}) \cdot c(\text{Stoffmengenkonzentration}) \cdot d(\text{Schichtdicke})$$

3.2.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Auftragspuffer

20 mM Phosphatpuffer:

20 mM Na₂HPO₄

20 mM NaH₂PO₄

pH 7,0

Elutionspuffer

100 mM Citratpuffer:

100 mM C₆H₈O₇

100 mM Na₃C₆H₅O₇

pH 2,8

Neutralisationspuffer

1 M Tris pH 9,0

Rekombinante Proteine mit IgG-Fc Teil wurden mit Hilfe der Protein-G-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Äkta-FPLC (*Fast protein liquid chromatography*)-Anlage (Pharmacia)

Methoden

aufgereinigt. Zur Herstellung gereinigter rekombinanter Antikörper wurde zunächst der Überstand stabil transfizierter HEK293-Zellen (siehe 3.3.8) gesammelt, bei 2500 g für 5 min bei RT zentrifugiert und mittels einer PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Porengröße 0,45 µm, Millipore) unter Vakuum sterilfiltriert. Die für die Aufreinigung benötigte Protein-G Säule (1 ml Volumen, Thermo Fisher Scientific) wurde mit 6 ml Auftragspuffer äquilibriert und nachfolgend mit dem Überstand bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Ungebundene Komponenten wurden im nächsten Schritt mit 6 ml Auftragspuffer aus der Säule gelöst. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml Elutionspuffer beladen, durch dessen niedrigen pH-Wert die Bindung zwischen IgG-Molekül und Protein G aufgehoben und der rekombinante Antikörper in Fraktionen von 2 ml Gesamtvolumen in 5 ml Gefäße mit jeweils 0,5 ml Neutralisationspuffer eluiert wurde. Die einzelnen Proteinfractionen wurden auf ihren Gehalt des aufgereinigten, rekombinanten Antikörpers mit Hilfe von reduzierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.4) und folgender Immunoblot-Analyse (siehe 3.2.6) überprüft. Fraktionen mit dem entsprechenden Protein wurden daraufhin in Dialyseschläuche gefüllt, über Nacht gegen die 100-fache Menge DPBS (1x) bei 4 °C dialysiert und anschließend wurde die Proteinkonzentration durch SDS-PAGE (siehe 3.2.4) unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.2.5) im Vergleich zu einer BSA-Standard-Verdünnungsreihe bestimmt.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung	10 % [w/v] APS in ddH ₂ O
SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)-Laufpuffer	250 mM Glycin 24 mM Tris 0,1 % [w/v] SDS pH 8,3
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth (Karlsruhe)
5x Proteinprobenpuffer	50 mM Trhis HCl (pH 6,8) 10 % [v/v] Glycerol 3 % [v/v] β-Mercaptoethanol (bei reduzierenden Bedingungen) 2 % [w/v] SDS 0,1 % [w/v] Bromphenolblau

Methoden

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen nach deren Molekülmasse. Hierfür wurden zunächst Sammel- und Trenngel unter Verwendung des TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (12 %, Bio-Rad) wie folgt hergestellt:

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Lösung A	4 ml	1,5 ml
Lösung B	4 ml	1,5 ml
10 % APS	30 µl	40 µl
TEMED	10 µl	4 µl

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Proteinprobenpuffer zu 1/5 des Gesamtvolumens versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben neben einem Proteingrößenstandard (Protein Marker IV, Peqlab) auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Eigenladung der Proteine wird mittels des im Laufpuffer und Gel enthaltenen SDS aufgehoben, welches die Proben mit einer gleichmäßigen, negativen Ladung behaftet, so dass diese ausschließlich entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Die Gelelektrophorese wurde bei 300 V und einem konstantem Stromfluss von 10 mA durchgeführt.

3.2.5 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Coomassie Färbe-Lösung	30 % [v/v] Ethanol
	10 % [v/v] Essigsäure
	0,25 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250
Coomassie Entfärbe-Lösung	30 % [v/v] Ethanol
	10 % [v/v] Essigsäure

Nach der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.4) wurden diese unter Verwendung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue R-250 detektiert und auf ihre Reinheit überprüft. Hierfür wurde das Polyacrylamid-Gel über Nacht bei RT in Coomassie Färbe-Lösung inkubiert und anschließend mit Hilfe der Coomassie Entfärbe-Lösung entfärbt. Für die Quantifizierung spezifischer Proteinbanden wurde das Gel eingescannt und mit Hilfe der Software ImageJ analysiert.

3.2.6 Immunoblot-Analyse

<i>Blocking</i> -Puffer	3 % [w/v] Milchpulver in TBS-T
TBS-T	150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 0,05 % TWEEN 20 pH 7,5
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)

Mit Hilfe der Immunoblot-Technik wurden Proteine nach der Auftrennung über SDS-PAGE (siehe 3.2.4) auf eine Membran transferiert und über spezifische Antikörper detektiert. Die für den Transfer benötigten Whatman-Filterpapiere sowie eine PVDF-Membran, welche zuvor für 1 min in 100 % Ethanol aktiviert wurde, wurden zunächst in Transferpuffer (1x) äquilibriert. Im nächsten Schritt wurde das Blot-Sandwich, wie nachfolgend dargestellt, zusammengesetzt:

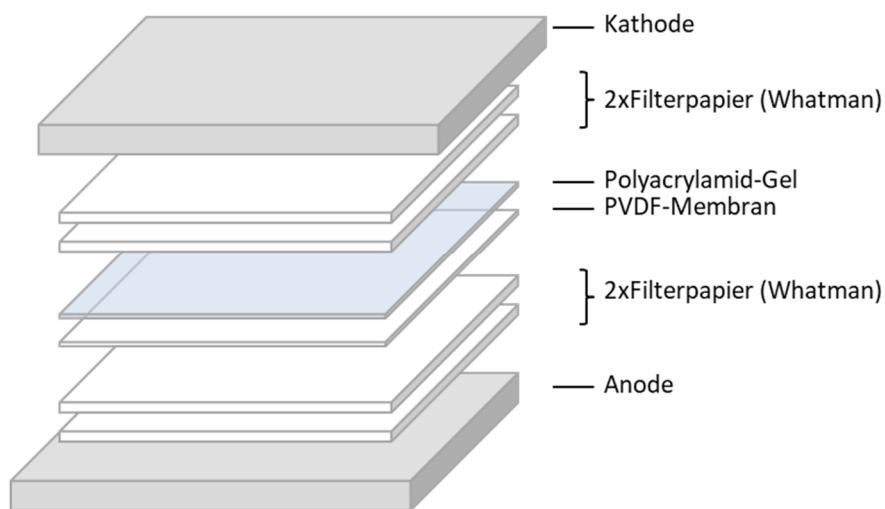


Abbildung 3.1: Aufbau des Blot-Sandwiches.

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte über das *Semi-dry*-Verfahren mittels des Trans-Blot Turbo Systems (Bio-Rad) unter Verwendung des vorinstallierten Programms für Proteine mit einer Molekülmasse zwischen 5 und 150 kDa (7 min bei 25 V und einem konstanten Stromfluss von 2,5 A). Daraufhin wurde die Membran für 1 h bei RT in *Blocking*-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Nach Verwerfen des Puffers folgte zum Nachweis des Proteins eine 1-stündige Inkubation bei RT mit einem spezifischen Primärantikörper, welcher zuvor entsprechend den Herstellerangaben in *Blocking*-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt wurde. Die Membran wurde anschließend dreimal je 3 min mit TBS-T gewaschen und für

eine weitere Stunde bei RT mit einem HRP (*Horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper versehen, welcher ebenfalls nach Herstellerangaben in *Blocking*-Puffer verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen für je 3 min wurde für die Analyse das ECL (*Enhanced chemiluminescence*)-Substrat (Thermo Fisher Scientific) auf die Membran gegeben. Hierbei wird im Rahmen einer Chemilumineszenz-Reaktion mittels HRP die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid induziert. Die daraus resultierende Lichtemission ermöglichte die Detektion des gewünschten Proteins am Fusion FX7.

3.2.7 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

PBS-T	8,06 mM Na ₂ HPO ₄
	1,47 mM KH ₂ PO ₄
	137 mM NaCl
	2,67 mM KCl
	0,05 % TWEEN
	pH 7,5
<i>Blocking</i> -Puffer	7,5 % [w/v] BSA in DPBS (1x)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Der ELISA detektiert die Bindung eines Antikörpers oder mehrerer Antikörper an ein Zielprotein und ermöglicht unter Verwendung eines geeigneten Standards unter anderem die Quantifizierung sekretierter Proteine in Zellkulturüberständen. In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung des sekretierten IL-15-Superagonisten RD-IL15 ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-Well-Platte mit 2 µg/ml anti-IL-15-Antikörper in einem Volumen von 100 µl DPBS (1x) pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden pro Vertiefung 200 µl 15 % [w/v] BSA in DPBS (1x) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Nach Verwerfen des Puffers wurde die 96-Well-Platte dreimal mit 200 µl PBS-T pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurde der Überstand Zytokin-sekretierender CAR-NK-92-Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Vertiefung in Triplikaten auf die Platte aufgetragen. Hierfür wurde konditioniertes Medium von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen verwendet und mit *Blocking*-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 oder 1:10 verdünnt (siehe 3.3.13). Als Proteinstandard diente eine serielle Verdünnung von rekombinantem His₆-RD-IL15 in *Blocking*-Puffer, ausgehend von einer Konzentration von 125 ng/ml. Als Kontrolle wurden mit *Blocking*-Puffer versetzte Vertiefungen mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Im darauf folgenden Schritt wurde die Platte erneut dreimal mit 200 µl PBS-T pro Vertiefung gewaschen, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C mit einem Biotin-gekoppelten IL-15R α -spezifischen Antikörper (0,5 µg/ml in 100 µl

Blocking-Puffer pro Vertiefung). Zur Detektion wurden nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T (200 µl pro Vertiefung) 100 µl HRP-gekoppeltes Streptavidin (Verdünnung von 1:10000 mit *Blocking*-Puffer) pro Vertiefung für 30 min bei 37 °C zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS-T (dreimal mit 200 µl pro Vertiefung) wurden 100 µl TMB-Lösung in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit 100 µl 1 N Schwefelsäure abgestoppt. Der durch die Reaktion entstehende gelbe Farbumschlag wurde an einem Spektrophotometer (SpectraMax® iD3) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen und murinen Zelllinien wurden in den in Tabelle 2.12 beschriebenen Medien kultiviert. Die Säugerzellen wurden im Brutschrank unter optimalen Bedingungen bei einer Luftfeuchte von 95 %, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer konstanten Temperatur von 37 °C inkubiert und in Abhängigkeit von ihrer Expansionsrate passagiert. Die Subkultivierung erfolgte bei adhärennten Zellen mittels enzymatischer Dissoziierung von einer entsprechenden Kulturunterlage. Hierbei wurde das Wachstumsmedium abgenommen, die Zellen wurden mit DPBS (1x) gewaschen und anschließend mit 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation im Brutschrank von wenigen Minuten wurde das Enzym durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium inhibiert. Nach Resuspension wurde ein Teil der Zellsuspension mit frischem Medium versetzt. Suspensionszellen wurden hingegen direkt in frischem Wachstumsmedium verdünnt und anschließend weiterkultiviert.

3.3.2 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Lymphozyten-Separations-Medium (Biocoll)

Biochrom GmbH (Berlin)

Unter PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*) werden Zellen des Blutes mit einem runden Zellkern zusammengefasst, wozu T-, B-, NK-Zellen, dendritische Zellen sowie Monozyten gehören. Für deren Isolierung wurden *Buffy-Coats* verwendet, welche beim Blutspendedienst Frankfurt am Main aus Vollblut gesunder Spender hergestellt wurden. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs von anderen Komponenten des peripheren Blutes wie Granulozyten und Erythrozyten getrennt. Hierzu wurden zunächst 40 ml *Buffy-Coat* mit 100 ml DPBS/EDTA (DPBS (1x) mit 2 mM

EDTA) verdünnt, wovon jeweils 35 ml auf 15 ml der Biocoll-Lösung in einem 50 ml Schraubdeckelröhrchen geschichtet wurden. Anschließend wurden die Proben für 35 min bei 400 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC-Schicht wurde daraufhin in ein neues Röhrchen überführt und in aufeinander folgenden Schritten für jeweils 10 min bei 300 g, 250 g und 200 g mit DPBS/EDTA gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die PBMCs in RPMI⁺⁺⁺ in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels des automatischen Zellzählungs-Gerätes Countess II (Thermo Fisher Scientific) oder per Hand mit Einweg-Zählkammern bestimmt (KOVA International, Amsterdam). Hierfür wurden zunächst 10 µl einer Zellsuspension 1:1 mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung versetzt, wovon für die automatische Zellzählung 10 µl beziehungsweise für die manuelle Zählung 15 µl in die entsprechenden Zählkammern pipettiert wurden. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der als nicht membranpermeables Reagenz ausschließlich tote Zellen anfärbt, so dass diese bei der Zählung ausgeschlossen werden können. Für die mikroskopische Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Einweg-Zählkammern wurde anschließend folgende Formel verwendet:

$$\text{Zelldichte [Zellen/ml]} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Raster}} \times 90 \text{ (Kammerfaktor)} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^3$$

3.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Langzeitlagerung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte mittels Kryokonservierung. Suspensionszellen wurden hierfür zunächst in frischem Medium resuspendiert, während adhärente Zellen vor Resuspendierung mit Trypsin/EDTA vorbehandelt wurden, wie in 3.3.1 beschrieben. Anschließend wurde die jeweilige Zellsuspension in 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und für 3 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Einfriermedium mit DMSO als Kryoprotektivum (siehe 2.11) in einer Dichte von $1,5$ bis $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Hiervon wurden jeweils 1,8 ml in 2 ml Kryoröhrchen pipettiert, welche anschließend in vorgekühlten, mit Isopropanol (100 %) gefüllten Gefrierbehältern (Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C über Nacht gelagert wurden. Die Zellen wurden am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff bei -196 °C transferiert.

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zur Beseitigung von DMSO in Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Am darauffolgenden Tag wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt.

3.3.5 Bestrahlung von Zellen

Die zu bestrahlenden Zellen wurden geerntet und in der gewünschten Zelldichte in 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Diese wurden in der Bestrahlungskammer des Biobeam GM 2000 (Gamma Service Medical) mit der gewählten Gammastrahlung bei einer Dosisrate von 2,5 Gy/min \pm 25 % bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und für folgende Experimente im entsprechenden Volumen ausgesät.

3.3.6 Generierung lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T-Zellen

Für die Herstellung VSV-G (Hüllprotein G des *Vesicular stomatitis virus*)-pseudotypisierter lentiviraler Vektorpartikel wurden am Vortag pro Ansatz 4×10^6 HEK293T-Zellen in einer 10 cm² Petrischale in einem Gesamtvolumen von 10 ml DMEM⁺⁺⁺ ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transfektion erfolgte über ein Drei-Plasmid-System, welches neben 10 µg Transferplasmid 6,5 µg Verpackungsplasmid (pCMV_ΔR8.91) sowie 3,5 µg Hüllplasmid (pMD2.G) umfasst, und wurde in dieser Arbeit mittels folgender Methoden durchgeführt:

PEI

Für die PEI (Polyethylenimin)-vermittelte Transfektion wurde 1 h vor Zugabe des Transfektionsansatzes das Kulturmedium abgenommen und durch 5 ml serumfreies Medium (DMEM⁺⁺) ersetzt. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl DPBS (1x) vorgelegt, mit 54 µl 10 mM linearem PEI (25 kDa; 2,7 µl PEI pro µg DNA) versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Hierbei findet die Bildung von Polyplexen zwischen anionischer DNA und kationischem PEI statt, durch deren positive Oberflächenladung die endozytotische Zellaufnahme ermöglicht wird. Der Ansatz wurde anschließend tröpfchenweise zu HEK293T-Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und durch 7 ml Kulturmedium ersetzt.

Calciumphosphat

Bei der Calciumphosphat-basierten Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden für 1 h in 5 ml frischem Kulturmedium bei 37 °C kultiviert, bevor der Transfektionsansatz hinzugegeben wurde. Hierfür wurde die Plasmid-DNA in der vorgegebenen Menge mit ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 450 µl verdünnt und mit 50 µl 2,5 M CaCl₂ versetzt. Anschließend wurden 500 µl des phosphathaltigen HBS-Puffers (2x) unter Vortexen zur Lösung getropft und für 5 min bei RT inkubiert. Dies führt zur Bildung eines Calciumphosphat-DNA Ko-Präzipitats, welches über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden kann. Nach der Zugabe von 10 µM

Chloroquin in das Kulturmedium zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde der Ansatz auf die Zellen getropft. Nach 16 h wurde ein Mediumwechsel mit 7 ml frischem DMEM⁺⁺⁺ durchgeführt.

Der virushaltige Kulturüberstand wurde 72 h nach Transfektion geerntet, mittels eines Spritzenfilters (0,45 µm) sterilfiltriert und für die weitere Verwendung bei 4 °C für maximal 7 Tage gelagert.

3.3.7 Lentivirale Transduktion von Säugerzellen

BX795 (Multi-Kinase-Inhibitor)

InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich)

Für die Transduktion von Suspensionszellen wurden pro Ansatz 5×10^5 Zellen für 3 min bei 1300 rpm und RT pelletiert, in 2 ml des Viruspartikel-enthaltenden Überstands aufgenommen und in die Vertiefung einer 6-Well-Platte überführt. Adhärenz Zellen wurden hingegen am Vortag in einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 2 ml Virusüberstand ersetzt. Für die Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden pro Ansatz 8 µg/ml Polybren zugegeben, welches die Ladungsabstoßung zwischen lentiviralen Vektorpartikeln und der Zellmembran minimiert [Davis et al., 2004]. Bei NK-92-Zellen wurde der Überstand zusätzlich mit 6 µM des Inhibitors BX795 versetzt, welcher durch die Hemmung des TBK1/IKKε-Komplexes und somit der antiviralen Immunantwort zu einer erhöhten Transduktion von NK-Zellen führt [Sutlu et al., 2012]. Es folgte eine Zentrifugation bei 1800 g und 32 °C für 90 min. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert.

3.3.8 Proteinproduktion in stabil transfizierten HEK293-Zellen

Die Produktion rekombinanter Antikörper erfolgte über die Transfektion von HEK293-Zellen mit einem pcDNA3-Expressionplasmid, welches für das entsprechende Protein kodiert. Hierfür wurden 10 µg des linearisierten Plasmids mit 27 µl 10 mM linearem PEI in 500 µl DPBS (1x) vermischt und nach 15-minütiger Inkubation zu den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das serumfreie Medium (DMEM⁺⁺) abgenommen und gegen Geneticin-haltiges Kulturmedium (Opti-MEM mit 1 mg/ml G418) ausgetauscht. Das auf dem Plasmid enthaltene Neomycin-Resistenzgen ermöglicht hierbei eine Selektion transfizierter Zellen mittels G418. Nach Erreichen einer 70 bis 80 %igen Konfluenz resistenter Zellklone wurde mit der Proteinproduktion begonnen. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand nach jeweils 48 h abgenommen und bei 4 °C gelagert, während die Zellen mit

frischem Selektionsmedium versorgt wurden. Nach 14 Tagen wurden die rekombinanten Proteine aus dem gesammelten Überstand aufgereinigt (siehe 3.2.3).

3.3.9 Durchflusszytometrische Analysen

FACS-Puffer	3 % [v/v] FBS in DPBS (1x)
Human BD Fc Block™ (Fc-Rezeptor Blockierlösung)	BD Biosciences (Heidelberg)
Mouse BD Fc Block™ (Fc-Rezeptor Blockierlösung)	BD Biosciences (Heidelberg)

Die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und primären Zellen erfolgte mit Hilfe der FACSCanto II oder LSRFortessa (BD Biosciences) Durchflusszytometer. Hierbei werden Zellen durch hydrodynamische Fokussierung mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit vereinzelt und durch einen Laserstrahl geführt. Die daraus entstehende Lichtstreuung gibt Aufschluss über die Beschaffenheit der analysierten Zellen, wobei Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter*, FSC) die Zellgröße und Seitwärtsstreulicht (*Side scatter*, SSC) die Granularität definiert. Des Weiteren können Zellen mit fluoreszierenden Merkmalen mittels Lasern entsprechender Wellenlängen untersucht werden. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo®v10 ausgewertet.

Bestimmung der Transduktionseffizienz

Die für die Transduktion verwendeten lentiviralen Transferplasmide kodieren unter anderem für den Fluoreszenzmarker eGFP oder sfGFP, womit der Anteil transduzierter Zellen aus einem heterogenen Zellpool durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Hierfür wurden nach Transduktion (siehe 3.3.7) und einer folgenden Kultivierungsdauer von 14 Tagen 5×10^5 der zu analysierenden Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen in einem Gesamtvolumen von 200 μ l überführt. Der Anteil eGFP- beziehungsweise sfGFP-positiver Zellen wurde ermittelt, wobei nicht transduzierte Zellen als Negativ-Kontrolle dienen.

Nachweis von Oberflächenantigenen

Für den Nachweis von Oberflächenantigenen wurden 5×10^5 der zu untersuchenden Zellen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen, in einem Gesamtvolumen von 200 μ l in ein Rundbodenröhrchen pipettiert und mit einem spezifischen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 2.6) versetzt. Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei 4 °C. Für die Untersuchung primärer Zellen wurde während der Färbung 1 μ l einer Fc-Rezeptor Blockierlösung zugegeben, um eine mögliche unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu minimieren. Bei Verwendung Fluorochromgekoppelter Primärantikörper wurden die Zellen anschließend mit FACS-Puffer gewaschen und direkt

analysiert. Im Fall von ungekoppelten Primärantikörpern wurde hingegen ein weiterer Färbungsschritt mit einem spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe 2.6) für 20 min bei 4 °C durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen dann durchflusszytometrisch analysiert. Ungefärbte und nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen dienten als Kontrollen.

3.3.10 Selektion transduzierter Säugerzellen

Fluoreszenzbasierte Zellsortierung

Die Anreicherung transduzierter Zellen erfolgte mit Hilfe des eGFP- beziehungsweise sfGFP-Fluoreszenzmarkers unter Verwendung des FACSAria Fusion (BD Biosciences). Hierfür wurden die Zellen nach Transduktion (siehe 3.3.7) für 14 Tage expandiert und anschließend für 3 min bei 1300 rpm und RT pelletiert. Abhängig von ihrer Dichte wurden die Zellen in 1 bis 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und für die Generierung einer Einzelzellsuspension über einen 35 µm Filter in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Mit Hilfe der FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse wurden eGFP- beziehungsweise sfGFP-positive Zellen aus der heterogenen Zellpopulation selektiert, für 3 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert und für die weitere Expansion in Kultivierungsmedium aufgenommen.

Selbstanreicherung

Für die Anreicherung von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen, welche den IL-15-Superagonisten RD-IL15 exprimieren, wurden die Zellen 3 Tage nach Transduktion (siehe 3.3.7) in IL-2 freies X-Vivo⁺ überführt und für einige Wochen expandiert. Der Anteil eGFP-positiver Zellen wurde alle 6 bis 8 Tage durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Zellen resuspendiert und 1 ml der Suspension in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer für 3 min bei 1300 rpm und RT erfolgte die Analyse am FACSCanto II (BD Biosciences).

3.3.11 Proliferationsassay

Die Auswirkung der Expression des IL-15-Superagonisten auf das Wachstumsverhalten von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen in Kultivierungsmedium ohne IL-2 wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays analysiert. Zu diesem Zweck wurden in eine 48-Well-Platte pro Vertiefung $2,5 \times 10^5$ Zellen in 1 ml X-Vivo⁺⁺ oder IL-2 freiem X-Vivo⁺ ausgesät, wobei parentale NK-92-Zellen wie auch CAR-modifizierte NK-92/hu14.18.28.z-Zellen ohne RD-IL15 als Kontrolle dienten. Die Zelldichte lebender sowie toter Zellen wurde alle 1 bis 3 Tage mittels Zählung mit dem Countess II-Gerät

bestimmt (siehe 3.3.3). Die für die Zählung abgenommenen 10 µl wurden anschließend mit einem äquivalenten Volumen an Medium wieder aufgefüllt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss des IL-15-Superagonisten auf die Proliferation von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nach Bestrahlung untersucht, wofür in eine 48-Well-Platte pro Vertiefung $2,5 \times 10^5$ bestrahlter oder unbestrahlter Zellen in 1 ml X-Vivo⁺⁺ ausgesät wurden. Hierbei wurden ebenfalls parentale NK-92-Zellen und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen als Kontrollen mitgeführt.

3.3.12 Zytotoxizitätsassay

Durchflusszytometrie

Calcein Violet AM (CV)	25 µg Stammlösung gelöst in 42 µl DMSO
Propidium-Iodid (PI)-Lösung	3 % [v/v] FBS 1 µg/ml Propidium-Iodid in DPBS (1x)

Die CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-92-Zellen (Effektorzellen) gegenüber humanen und murinen Tumorzellen (Zielzellen) wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des FACSCanto II (BD Biosciences) untersucht. Hierfür wurden zunächst 4×10^5 Zielzellen in 1 ml serumfreiem Kultivierungsmedium mit 1,5 µl Calcein Violet (CV) versetzt und für 20 min bei 4 °C gefärbt. Hiermit kann bei späterer Analyse zwischen Effektor- und Zielzellen unterschieden werden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 20 ml serumfreiem Medium für 3 min bei 1300 rpm und RT gewaschen und zuletzt in 10 ml X-Vivo⁺⁺ aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zielzellen auf eine Dichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Effektorzellen wurden geerntet, ebenfalls gezählt und mit den bereits vorgelegten Zielzellen bei Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 vermischt. Für die Bestimmung der spontanen Lyse wurden Zielzellen ohne Effektorzellen ausgesät. Nach einer Ko-Inkubation von 4 h bei 37 °C wurde die Platte für 3 min bei 1300 rpm und RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die einzelnen Zellpellets wurden in jeweils 80 µl PI-Lösung aufgenommen, in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und analysiert. Propidiumiodid färbt apoptotische Zellen, so dass der Anteil CV- und PI-doppelt positiver Zielzellen, von welchem die spontane Lyse abgezogen wird, den Wert der von Effektorzellen induzierten Lyse wiedergibt.

Konfokale Mikroskopie

CellTrace™ CFSE	5 mM Stammlösung
(Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)	gelöst in 18 µl DMSO
CellTrace™ Far Red	1 mM Stammlösung
	gelöst in 20 µl DMSO

Die kinetische Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 erfolgte am CQ1 (Yokogawa). Zunächst wurden Effektorzellen mit CellTrace™ CFSE und Zielzellen mit CellTrace™ Far Red gefärbt, um sie bei der späteren Analyse unterscheiden zu können. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml DPBS (1x) mit 1 µl des entsprechenden Farbstoffs versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen in 5 ml X-Vivo⁺⁺ resuspendiert, für weitere 5 min bei RT inkubiert und für 3 min bei 1300 rpm pelletiert. Zielzellen wurden mit X-Vivo⁺⁺ auf eine Dichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt, in einem Gesamtvolumen von 100 µl in die Vertiefung einer 96-Well-Platte gegeben und anschließend mit 100 µl Effektorzellen in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 5:1 vermischt. Unmittelbar vor der Analyse wurde pro Vertiefung NucView® 405 Caspase-3-Substrat (Biotium, Inc.) in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben. NucView®-Caspase-*Biotracker* besteht aus einer Caspase-3/-7-Erkennungssequenz (DEVD-Peptid) und einem membranpermeablen DNA-Farbstoff, dessen Fluoreszenz durch das gebundene DEVD-Peptid gehemmt wird. Durch aktive Caspase 3 und 7 wird das DEVD-Peptid geschnitten, was die Translokation des fluorogenen DNA-Farbstoffs in den Zellkern und seine Bindung an die DNA ermöglicht. Dies führt zur fluoreszenten Markierung apoptotischer Zielzellen. Die 4-stündige Ko-Inkubation wurde mittels Zeitraffer-Mikroskopie analysiert.

3.3.13 Transwell-Experimente

ThinCert® Cell Culture Insert (24-Well-Platte, Porengröße 0,4 µm)	Greiner Bio-One (Frickhausen)
--	-------------------------------

Der Einfluss des von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 sekretierten IL-15-Superagonisten auf benachbarte Immunzellen wurde mit Hilfe von Transwell-Assays untersucht. PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.3.2) beziehungsweise primäre NK-Zellen mit Hilfe des *RosetteSep™ Human NK Cell Enrichment Cocktails* (STEMCELL™) isoliert und am nächsten Tag mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen kultiviert. Durch die Verwendung von Transwell-Zellkultureinsätzen wurden dabei beide Zellpopulationen voneinander getrennt, jedoch wurde die Diffusion von löslichen Faktoren weiterhin ermöglicht. Um eine höhere Konzentration an sekretierten Faktoren während des Transwell-Experiments zu erreichen, wurden die für die Ko-

Methoden

Kultivierung verwendeten NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen in ihrem konditionierten Medium ausgesät. Hierfür wurden 1×10^6 RD-IL15 sekretierende CAR-NK-92-Zellen pro 1 ml IL-2-freiem X-Vivo⁺ ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Das Medium wurde anschließend gesammelt, für 3 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert und mittels eines Spritzenfilters (Porengröße 0,45 μm) filtriert. Als Positiv-Kontrolle wurden PBMCs mit rekombinantem humanem IL-15 (huIL-15) in einer definierten Konzentration von 20 ng/ml versetzt. Zudem wurden Negativ-Kontrollen mitgeführt, wofür PBMCs zum einen mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen, welche in ihrem konditionierten Medium ausgesät wurden, ko-inkubiert und zum anderen ohne jegliche Zugabe immunstimulatorischer Faktoren kultiviert wurden.

Transwell-Zytotoxizitätassay

Mit Hilfe des Transwell-Zytotoxizitätsassays wurde der Einfluss von sekretiertem RD-IL15 auf die zytotoxische Aktivität von PBMCs untersucht. In eine 24-Well-Platte wurden pro Vertiefung $2,4 \times 10^6$ PBMCs in 1 ml IL-2 freiem X-Vivo⁺ ausgesät und unter verschiedenen Bedingungen für 16 h stimuliert. Für die Ko-Inkubation mit CAR-NK-92-Zellen wurden die NK-Zellen geerntet, für 3 min bei 1300 rpm und RT pelletiert und mit ihrem jeweiligen konditionierten Medium auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Darauffolgend wurden die CAR-NK-92-Zellen in einem Volumen von 300 μl in die Transwell-Zellkultureinsätze überführt, welche zuvor in die entsprechenden Vertiefungen mit den bereits vorgelegten PBMCs gesetzt wurden. Am nächsten Tag wurden K562-Zellen geerntet, mit Calcein Violet gefärbt (siehe 3.3.12) und in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 20:1 in einem Gesamtvolumen von 200 μl X-Vivo⁺ den PBMCs zugegeben. Nach 2 h wurde der Zytotoxizitätsassay abgestoppt. Hierfür wurden die Ko-Kulturen aus PBMCs und K562 resuspendiert, in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und mit DPBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden die Proben am FACSCanto II unter Verwendung von PI analysiert (siehe 3.3.12).

Transwell-Gemischte Lymphozytenreaktion (GLR)

MojoSort™ Human CD3 Selection Kit

BioLegend (Koblenz)

Ebenso wurde eine mögliche Wirkung des IL-15-Superagonisten auf die Proliferation und Aktivierung benachbarter Immunzellen analysiert. Hierfür wurden PBMCs beziehungsweise primäre NK-Zellen (Effektorzellen) einen Tag nach Isolierung mit CFSE gefärbt und mit X-Vivo⁺ auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Ko-Inkubation mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen wurden $1,5 \times 10^5$ Effektorzellen in einen Transwell-Einsatz in einem Gesamtvolumen von 200 μl überführt und in eine 24-Well-Platte, in welche 3×10^5 NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen in 1 ml konditioniertem Medium pro Vertiefung vorgelegt wurden, eingebracht. Als Negativ-Kontrolle

dienten zum einen Transwell-Ko-Kulturen aus Effektorzellen und CAR-NK-92-Zellen ohne ektopische RD-IL15-Expression. Als weitere Kontrollen wurden zum anderen jeweils $1,5 \times 10^5$ Effektorzellen direkt in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte in einem Volumen von 200 μ l X-Vivo⁺ pipettiert. Diese wurden ohne die Zugabe immunstimulatorischer Faktoren kultiviert oder mit hIL-15 (20 ng/ml) versetzt.

Parallel wurde dieser Assay als Gemischte Lymphozytenreaktion (GLR) unter Verwendung von Stimulatorzellen angesetzt. Hierfür wurden PBMCs eines Zweitspenders isoliert, einer CD3-Negativselektion unterzogen und bei 25 Gy bestrahlt (siehe 3.3.5). Anschließend wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 mit den CFSE-gefärbten PBMCs als Effektorzellen vermischt, auf 200 μ l mit X-Vivo⁺ aufgefüllt und in die einzelnen Well-Platten überführt. Die immunstimulatorische Wirkung auf Effektorzellen wird hierbei über den allogenen MHC I-Komplex der Stimulatorzellen vermittelt.

Nach viertägiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Restimulierung, wofür die Effektorzellen beziehungsweise im Fall der GLR die Ko-Kulturen aus Effektor- und Stimulatorzellen aus den jeweiligen Vertiefungen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 3 min bei 1300 rpm abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden diese in frischem Kulturmedium aufgenommen und in die ursprünglichen Vertiefungen pipettiert. Es folgte die Stimulierung unter den jeweiligen, zuvor beschriebenen Bedingungen: Für die Transwell-basierten Ko-Kulturen wurden Effektorzellen beziehungsweise Effektor-/Stimulatorzellen in die Transwell-Einsätze einer 24-Well-Platte transferiert und mit CAR-NK-92-Zellen, welche in konditioniertem Medium verdünnt wurden, ko-kultiviert. Für nicht Transwell-basierte Ansätze wurden die Zellen direkt in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte eingebracht und erneut ohne den Zusatz immunstimulatorischer Faktoren kultiviert oder mit hIL-15 (20 ng/ml) versetzt. Am Tag 8 wurden die Effektorzellen aus den Vertiefungen entnommen, in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und mit DPBS (1x) gewaschen. Am FACSCanto II wurde über die Abnahme des CFSE-Signals und unter Verwendung spezifischer Antikörper (CD3/8/45RO/56/197) (siehe 2.6) die Proliferation von CD8-positiven T-Zellen und NK-Zellen sowie die Differenzierung von T-Gedächtniszellen analysiert.

3.4 Experimente mit Mäusen

Vetflurane®

Virbac (Bad Oldesloe)

3.4.1 Haltung von Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurden für Tierversuche NSG-Mäuse eingesetzt. Diese tragen zum einen eine spontane *scid* (*Severe combined immune deficiency*) Mutation des *Prkdc*-Gens und zum anderen eine Null-Mutation der γ -Kette des IL-2-Rezeptors, welche zu einer Abwesenheit funktionaler B-, T- und NK-Zellen führen. Die Mäuse wurden in der Tierversuchseinrichtung des Georg-Speyer-Hauses gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte in Käfigen mit eigener Luftzufuhr bei einem 14 h Hell-/ 10 h Dunkel-Zyklus, 55 % relativer Luftfeuchte und einer konstanten Temperatur von 22 °C. Tierexperimente wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.4.2 Induktion und Behandlung GD₂-positiver Tumoren

Xenotransplantation von UKF-NB3/Luc Tumoren

Neun Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen wurden jeweils 1×10^6 UKF-NB3/Luc-Zellen in einem Volumen von 100 μ l DPBS (1x) intravenös verabreicht. Nach 23 Tagen wurden die Mäuse mittels intravenöser Injektion mit 1×10^7 parentalen NK-92-Zellen oder GD₂-spezifischen NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 in einem Gesamtvolumen von 100 μ l Injektionsmedium einmal wöchentlich für vier Wochen behandelt. Tumortragende Mäuse, welchen lediglich 100 μ l zellfreies Injektionsmedium appliziert wurden, dienten als Kontrolle. Während des Experiments erfolgte eine regelmäßige Überwachung des Tumorwachstums (siehe 3.4.3) und des Zustands und Gewichts der Tiere, wobei nach Erreichen vordefinierter Abbruchkriterien eine zervikale Dislokation unter Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt wurde.

Allotransplantation von EL4/Luc Tumoren

Für die Generierung eines EL4-Mausmodells wurden zunächst im Rahmen eines Dosisfindungsexperiments sechs bis acht Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen 1×10^5 , 5×10^5 oder 1×10^6 EL4/Luc-Zellen in 100 μ l DPBS (1x) intravenös verabreicht. Für das anschließende Behandlungsexperiment wurde die Dosis von 1×10^5 EL4/Luc-Zellen gewählt. Die Tumorzellen wurden sechs bis zwölf Wochen alten weiblichen NSG-Mäusen in einem Volumen von 100 μ l DPBS (1x) in die Schwanzvene appliziert. 6 Tage nach Tumorinokulation erfolgte die Behandlung mittels intravenöser Injektion von 1×10^7 parentalen NK-92-Zellen oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen mit oder ohne ektopische RD-IL15-Expression in einem Gesamtvolumen von 100 μ l Injektionsmedium. Der Kontrollgruppe wurden 100 μ l zellfreies Injektionsmedium verabreicht. Die Behandlung wurde zweimal wöchentlich für vier Wochen durchgeführt. Das Tumorwachstum wurde

in regelmäßigen Abständen gemessen (siehe 3.4.3). Des Weiteren wurden der Allgemeinzustand und das Gewicht der Tiere während des Experiments regelmäßig überprüft. Bei Erreichen festgelegter Abbruchkriterien erfolgte eine zervikale Dislokation unter Isofluran-Inhalationsnarkose.

3.4.3 *In vivo* Bildgebung

Das Tumorwachstum nach intravenöser Applikation von Luciferase-exprimierenden Zellen wurde mehrmals wöchentlich mit Hilfe des IVIS Lumina II (Perkin Elmer) durch BLI (*Bioluminescence imaging*)-Messungen bestimmt. Hierfür wurde den Tieren nach Narkotisierung mit Isofluran subkutan jeweils 1,5 mg D-Luciferin in 100 µl Gesamtvolumen gespritzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 min wurden die Mäuse in die Dunkelkammer gelegt. Es erfolgte eine konstante Sedierung über Masken mittels Isofluran, während dorsale sowie ventrale Aufnahmen von je 1, 10, 30, 60 und 120 s erstellt wurden. Anschließend wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige gesetzt und die Aufwachphase kontrolliert.

3.4.4 Organentnahme bei Mäusen

Organentnahmen wurden nach Tötung durch zervikale Dislokation unter Isofluran-Narkose durchgeführt.

HE-Färbung

Organe symptomatischer Mäuse wurden entnommen und für 24 h in einer 4 % Formaldehydlösung (Roti-Histofix®, Roth) fixiert. Die anschließende Herstellung von Gewebeschnitten und deren Färbung mittels einer Hämatoxylin- und Eosin-Lösung (HE-Färbung) zur Bestimmung tumorösen Gewebes erfolgten in der Histologie-*Core Facility* des Georg-Speyer-Hauses.

***Ex vivo* Bildgebung**

Innere Organe, Wirbelsäule und Femur symptomatischer NSG-Mäuse wurden entnommen und in eine 6-Well-Platte, in welche 300 µg/mL D-Luciferin in DPBS (1x) in einem Gesamtvolumen von 3 ml pro Vertiefung vorgelegt war, übertragen. Die Platte wurde anschließend in die Dunkelkammer gestellt und es wurde eine Biolumineszenz-Messung am IVIS Lumina II bei einer Belichtungszeit von 10 s durchgeführt. Als Kontrolle diente Gewebe einer NSG-Maus, welcher keine EL4/Luc-Zellen injiziert wurden.

Durchflusszytometrische Analyse

FACS-Puffer	3 % [v/v] FBS 2 mM EDTA in DPBS (1x)
-------------	--

Die Milz symptomatischer Mäuse wurde nach Isolierung zunächst mit Hilfe eines Spritzenstößels zerkleinert, durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm, Corning™) gedrückt und mit 10 ml FACS-Puffer in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß gespült. Es folgten zwei Waschschrte für 3 min bei 1300 rpm und RT. Die vereinzelt Zellen wurden anschließend gezählt und der prozentuale Anteil von EL4/Luc-Zellen wurde am FACSCanto II unter Verwendung des Lebend-Tot-Markers eFluor™ 780, eines APC-markierten GD₂-spezifischen Antikörpers (siehe 2.6) und anhand des sfGFP-Markers bestimmt.

3.5 Statistische Analysen

Statistische Berechnungen erfolgten mit der Prism Software (GraphPad, La Jolla, USA). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden – wenn nicht anders angegeben – in Form von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und die erhaltenen Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung (*Standard deviation, SD*) dargestellt. Hierfür wurde der ungepaarte Welch T-Test angewendet. Mögliche Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven von NSG-Mäusen wurden über den Log-Rank-Test bestimmt. P-Werte < 0,05 wurden hierbei als statistisch signifikant gesehen. Die in dieser Arbeit berechneten Signifikanzen sind wie folgt dargestellt:

*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

4 Ergebnisse

Die Behandlung solider Tumoren mittels CAR-modifizierter Effektorzellen zeigt im Vergleich zur Therapie hämatologischer Krebserkrankungen bisher nur begrenzt Erfolg. Die Herausforderungen liegen hierbei in der meist eingeschränkten Migration der Effektorzellen zum Tumor und dessen mangelnde Infiltrierung sowie in der Beeinträchtigung durch ein immunsuppressives Tumormikromilieu. Des Weiteren erschwert die oft heterogene Expression tumorassoziierter Antigene (TAA) die Wahl eines passenden Zielantigens [Marofi et al., 2021]. Basierend auf vorhergehenden Arbeiten unserer Gruppe erwies sich hierbei das Gangliosid GD₂ als vielversprechend. Dieses weist eine erhöhte Expression unter anderem in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs auf, während sich die Expression im gesunden Gewebe auf das zentrale Nervensystem, periphere Nerven und Melanozyten der Haut beschränkt [Nazha et al., 2020]. So induzierte die Modifikation von NK-92-Zellen mit einem GD₂-spezifischen CAR der ersten Generation eine gesteigerte Antitumoraktivität sowohl gegenüber etablierten und primären Neuroblastom-Zellen wie auch GD₂-positiven Tumorzellen anderen Ursprungs [Esser et al., 2012; Seidel et al., 2015].

Um zudem dem immunsuppressiven Umfeld des Tumors entgegenzuwirken, kann mit Zytokinen oder therapeutischen Antikörpern wie *Immune checkpoint*-Inhibitoren ein pro-inflammatorisches Milieu geschaffen und damit Überleben, Expansion und Antitumoraktivität von NK-Zellen gesteigert werden [Habif et al., 2019].

Ziel dieser Arbeit war es, NK-92-Zellen mit einem optimierten, GD₂-spezifischen CAR der zweiten Generation zu modifizieren und in den Zellen gleichzeitig den IL-15-Superagonisten RD-IL15 zu exprimieren. Die Auswirkung der RD-IL15-Sekretion auf die CAR-NK-92-Zellen wurde sowohl im Hinblick auf deren Proliferationsverhalten als auch deren Zytotoxizität gegenüber diversen Tumorentitäten untersucht. Zudem wurde ein möglicher stimulierender Effekt auf benachbarte Immunzellen analysiert. Neben diesen *in vitro* Untersuchungen wurden die GD₂-CAR-vermittelte Antitumoraktivität und ein möglicher Einfluss von sekretiertem RD-IL15 auch in Maus-Tumormodellen *in vivo* evaluiert. Als Alternative zu GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen wurde zudem ein GD₂-spezifischer, IgG1-basierter Antikörper generiert und dessen Einfluss auf die Zytotoxizität primärer Immunzellen gegenüber NK-Zell-resistenten Tumorzellen *in vitro* ermittelt.

4.1 Generierung und funktionelle Charakterisierung GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen

4.1.1 Generierung eines bicistronischen lentiviralen Vektors kodierend für einen GD₂-spezifischen CAR und RD-IL15 zur Transduktion von NK-92-Zellen

Für die Etablierung GD₂-spezifischer NK-92-Zellen wurde zuvor ein CAR-Konstrukt generiert, das am N-Terminus das Signalpeptid einer schweren IgG-Kette aufweist, gefolgt von einer scFv (*Single chain fragment variable*)-Domäne, welche sich von einer humanisierten Variante des GD₂-spezifischen murinen 14.18-Antikörpers ableitet [Gillies und Lo, 2004]. Dieses Antikörperfragment setzt sich aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Antikörperketten zusammen, die humane strukturgebende Regionen (*Framework regions*, FR) sowie die primär mit GD₂ interagierenden murinen hypervariablen Regionen (*Complementary determining regions*, CDR) enthalten. V_H und V_L sind dabei über einen (G₄S)₄-*Linker* miteinander verbunden und liegen in der V_H-V_L-Orientierung vor. Die scFv(hu14.18)-Domäne wurde am C-Terminus mit einem Myc-*Tag* für den immunologischen Nachweis des CARs und der flexiblen Gelenkregion (*hinge*) des humanen CD8α-Moleküls versehen. Es folgen die Transmembrandomäne des humanen CD28-Moleküls zur Verankerung des CARs in der Zellmembran und die intrazelluläre Domäne von CD28, welche zusammen mit der C-terminalen CD3ζ-Kette als Teil des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes die intrazellulären Signaldomänen bildet (Schönfeld et al., unveröffentlicht; siehe Abb. 4.1, A). Die Verwendung eines CARs der zweiten Generation stützte sich dabei auf vorherige Publikationen unserer Gruppe, welche in *in vitro* Experimenten mit ErbB2- und CD19-spezifischen CAR-NK-92-Zellen aufzeigten, dass der Einsatz einer zusätzlichen CD28-Signaldomäne zu einer gesteigerten Antitumoraktivität und zu einer erhöhten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN γ und GM-CSF führen kann [Schönfeld et al., 2015; Oelsner et al., 2017]. Zudem zeigten primäre GD₂-spezifische CAR-NK-Zellen mit einer ko-stimulatorischen Signaldomäne wie 4-1BB in Kombination mit CD3ζ *in vitro* eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Zielantigen-exprimierenden Tumorzellen [Altwater et al., 2009; Kailayangiri et al., 2017].

Die CAR-Sequenz hu14.18.28.z wurde in das lentivirale Transferplasmid pSIEW unter Kontrolle des SFFV (*Spleen focus-forming virus*)-Promotors eingebracht und am 3'-Ende über eine IRES-Sequenz mit dem Fluoreszenzmarker eGFP zur durchflusszytometrischen Bestimmung modifizierter NK-92-Zellen verknüpft (siehe Abb. 4.1, C). In einem zweiten Konstrukt wurde im Rahmen dieser Arbeit der IL-15-Superagonist RD-IL15 als Zytokindomäne über eine P2A-Sequenz an den C-Terminus des CAR-Konstrukts gekoppelt, gefolgt von IRES und eGFP (siehe Abb. 4.1, D). RD-IL15 stellt ein Fusionsprotein

Ergebnisse

dar, bestehend aus der Sushi-Domäne von IL-15R α (Aminosäuren 31-107, IL-15R α_{31-107}) und der IL-15-Mutante IL-15_{N72D}, welche sich durch den Austausch von Asparagin durch Asparaginsäure an der Aminosäureposition 72 definiert und über einen *GS-Linker* an den C-Terminus von IL-15R α_{31-107} gebunden ist. Sowohl die Fusion von IL-15 an dessen Rezeptoruntereinheit IL-15R α als auch der Aminosäureaustausch mittels gezielter Mutagenese führt zu einer verstärkten Bindung an den IL-15R β/γ -Rezeptorkomplex und einer gesteigerten biologischen Aktivität der IL-15-Mutante im Vergleich zu deren Wildtyp-Form [Mortier et al., 2006; Zhu et al., 2009]. Die Sekretion von RD-IL15 erfolgt über das von einer schweren IgG-Kette abgeleitete N-terminale Signalpeptid (siehe Abb. 4.1, B und D).

Die Generierung des CAR-Konstrukts hu14.18.28.z_RD-IL15 wurde mit Hilfe des isothermalen Zusammenbaus nach Gibson durchgeführt. Hierfür wurden mit spezifischen Überhangprimern die Sequenz hu14.18.28.z aus dem Plasmid pS-hu14.18.28.z-IEW (Schönfeld et al., unveröffentlicht) und die P2A-RD-IL15-Sequenz aus dem Plasmid pMK-eGFP-P2A-RD-IL15 (Häcker et al., unveröffentlicht) mittels PCR vervielfältigt. Das lentivirale Transferplasmid pHR'SIN-cPPT-SIEW (pSIEW) diene als Rückgrat und wurde hierfür mit dem Restriktionsenzym *SacII* geschnitten und linearisiert. Anschließend wurden die PCR-Fragmente hu14.18.28.z und P2A-RD-IL15 in den Transfervektor pSIEW unter Kontrolle des SFFV-Promotors eingebracht.

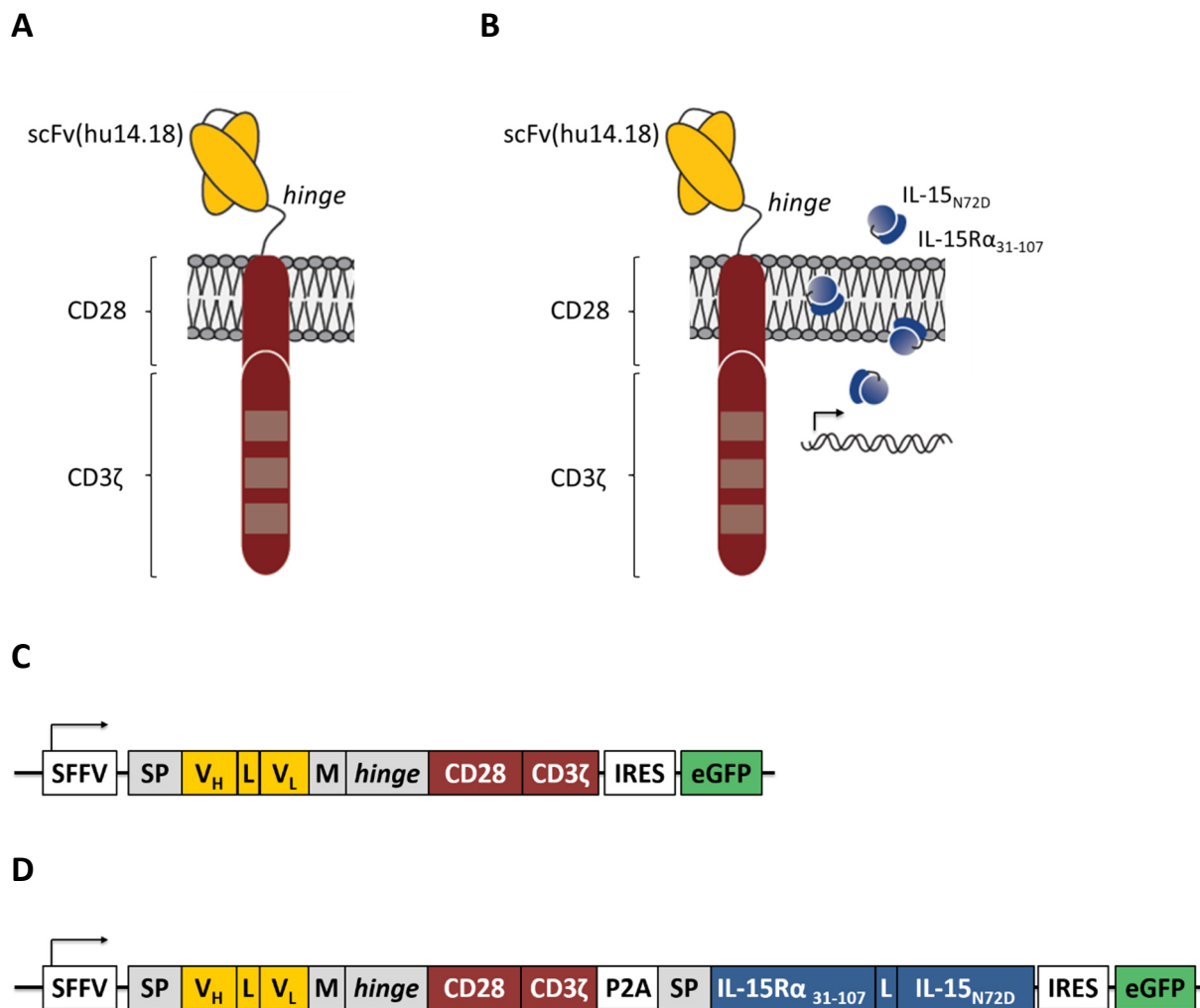


Abbildung 4.1: GD₂-spezifische chimäre Antigenrezeptoren (CAR). (A und B) Schematische Darstellung der GD₂-spezifischen CARs. (A) Hu14.18.28.z. Die extrazelluläre Domäne des CARs hu14.18.28.z besteht aus dem scFv-Antikörperfragment, welches sich von den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette des humanen GD₂-spezifischen Antikörpers 14.18 ableitet. Dieses ist über einen Myc-Tag und eine Gelenkregion (*hinge*) mit der CD28-Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne von CD28 verbunden, welche am C-Terminus mit der CD3ζ-Kette fusioniert ist und mit dieser die intrazellulären Signaldomänen bildet. (B) Hu14.18.28.z_RD-IL15. Einen modifizierten Therapieansatz stellt das Einbringen proinflammatorischer Zytokine wie des IL-15-Superagonisten RD-IL15 dar, welcher aus der Sushi-Domäne des IL-15Rα (IL-15Rα₃₁₋₁₀₇) und mutiertem IL-15_{N72D} besteht. Eine derartige Modifikation führt zur Sekretion von RD-IL15 durch NK-92-Zellen, welche zugleich den CAR hu14.18.28.z an der Oberfläche exprimieren. (C und D) Aufbau der Konstrukte zur Expression der GD₂-spezifischen CARs. (C) Zur Generierung GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen wurde das CAR-Konstrukt hu14.18.28.z in das Transferplasmid pSIEW unter Kontrolle des SFFV-Promotors eingebracht. (D) Für die Generierung eines optimierten CAR-Konstrukts wurde der Superagonist RD-IL15 über die P2A-Sequenz an den C-Terminus des CARs fusioniert. Das daraus resultierende CAR-Konstrukt hu14.18.28.z_RD-IL15 wurde ebenfalls in das Transferplasmid pSIEW unter Kontrolle des SFFV-Promotors eingefügt. Die Transgene sind am 3'-Ende über eine IRES-Sequenz mit dem Markergen eGFP verknüpft. SFFV: SFFV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, L: GS-Linker, M: Myc-Tag, *hinge*: Gelenkregion von CD8α, P2A: 2A-Peptid des porzinen Teschovirus 1, IRES: *Internal ribosome entry site*, eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*.

Im darauf folgenden Schritt wurden HEK293T-Zellen zur Generierung VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Vektorpartikel jeweils mit den Transferplasmiden pS-hu14.18.28.z-IEW und pS-

Ergebnisse

hu14.18.28.z_RD-IL15-I EW in Kombination mit dem Verpackungsplasmid pCMV_ΔR8.91 und dem Hüllplasmid pMD2.G ko-transfiziert [Zufferey et al., 1997]. Nach drei Tagen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand gesammelt und für die Transduktion von NK-92-Zellen eingesetzt. Nach mehrtägiger Kultivierung wurde der Anteil erfolgreich modifizierter Zellen mittels der Expression des Markerproteins eGFP durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Abb. 4.2). Transduzierte NK-92-Zellen wurden mit Hilfe des FACS Aria Fusion anhand ihrer eGFP-Expression sortiert und anschließend expandiert.

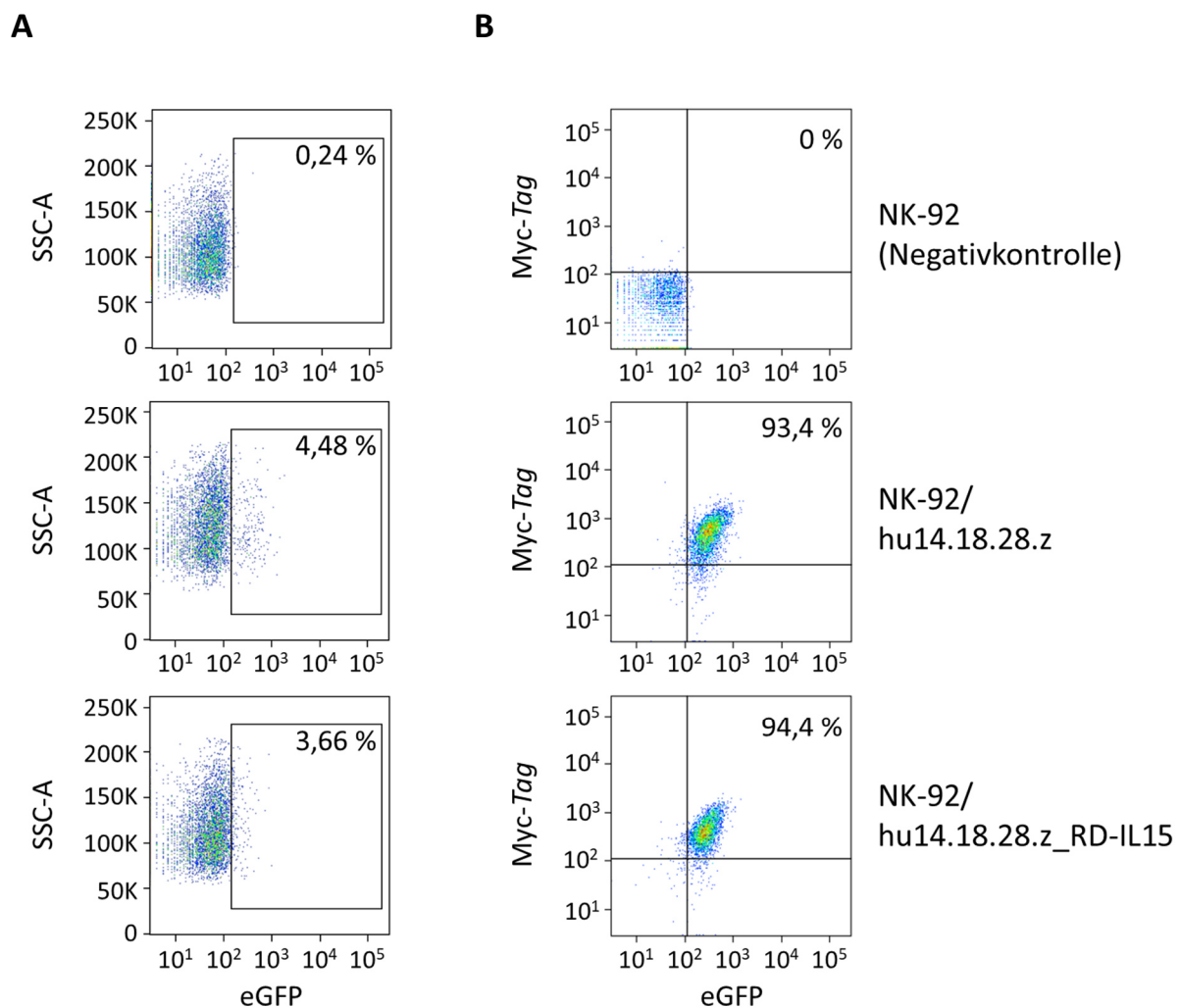


Abbildung 4.2: Anreicherung lentiviral transduzierter NK-92-Zellen mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung. Durchflusszytometrische Analyse der modifizierten NK-92-Zellen vor (A) und nach (B) der Zellsortierung. Der prozentuale Anteil der NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde mittels Analyse der eGFP-Expression bestimmt und die Oberflächenexpression des GD₂-spezifischen CARs zusätzlich durch Bindung eines AF647-gekoppelten Myc-Tag-spezifischen Antikörpers bestätigt (B). Parentale NK-92-Zellen dienten als Negativkontrolle.

In nachfolgenden Kultivierungsschritten wurde der Anteil von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen regelmäßig mit Hilfe von eGFP und einem AF647-gekoppelten Myc-

Ergebnisse

Tag-spezifischen Antikörper zur Detektion der CAR-Expression durchflusszytometrisch überprüft. Wenn nötig, wurde ein weiterer Sortierungsschritt durchgeführt, um einen reinen Zellpool eGFP-positiver, GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen zu erhalten. Dadurch konnte eine Steigerung des Anteils modifizierter Zellen von 3,66 % – 4,48 % auf 93,4 % – 94,4 % erreicht werden. Die Analysen zeigten dabei ein vergleichbares Expressionsniveau der CARs hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15.

Nach Generierung von homogenen Zellpopulationen modifizierter NK-92-Zellen wurde in einem weiteren Schritt deren CAR-Expression mittels Immunoblot-Analyse bestätigt (siehe Abb. 4.3). Hierfür wurden Proteinlysate sowohl von parentalen NK-92-Zellen als auch NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen hergestellt und nach SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern gegen CD8 α und γ -Tubulin analysiert. Eine spezifische Proteinbande des CARs hu14.18.28.z konnte in den Lysaten von beiden transduzierten NK-92-Populationen nachgewiesen werden. Diese wies eine höhere molekulare Masse als die theoretische Molekülmasse des CARs von etwa 57 kDa auf, was auf eine wahrscheinliche Glykosylierung des Proteins hinweist. Eine weitere spezifische Bande wurde im Lysat RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen detektiert, die sich auf das ungeschnittene Fusionsprotein hu14.18.28_RD-IL15 zurückführen ließ. Hierbei wurde ebenso eine höhere Molekülmasse als die aus der primären Aminosäuresequenz berechnete molekulare Masse von circa 84 kDa ermittelt. Dies ist ebenfalls durch eine wahrscheinliche Glykosylierung des Proteins zu erklären. Lysate parentaler Zellen zeigten erwartungsgemäß kein entsprechendes Signal.

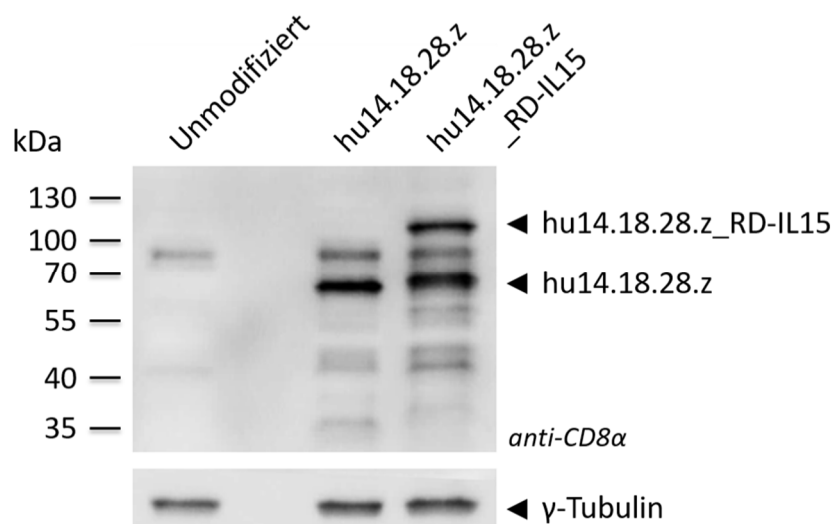


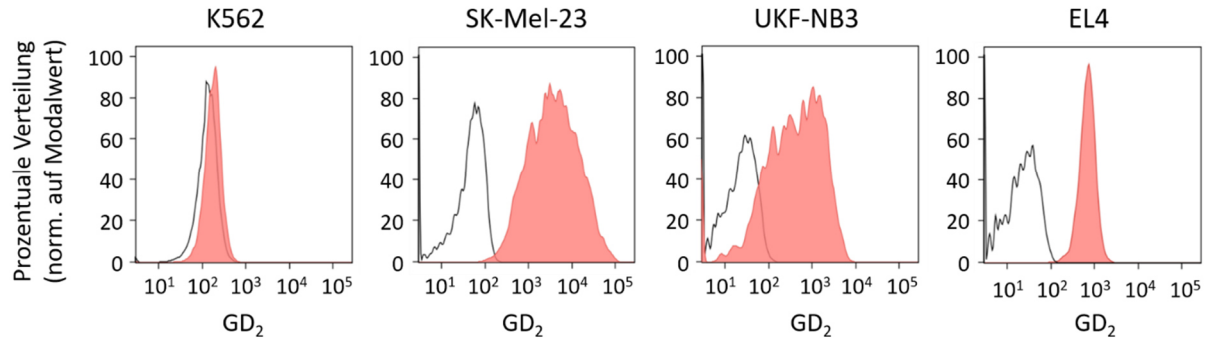
Abbildung 4.3: Analyse der CAR-Expression lentiviral transduzierter NK-92-Zellen mittels Immunoblot. Proteinlysate von jeweils 5×10^6 parentalen NK-92-, NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen aufbereitet. 30 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Lysate wurden anschließend über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Analyse der CAR-Expression wurde die Membran mit einem CD8 α -spezifischen Primärantikörper inkubiert. Als Ladekontrolle wurde ein γ -Tubulin-spezifischer Antikörper verwendet. Der Nachweis der Proteinbanden

erfolgte mittels eines Spezies-spezifischen, HRP-markierten Sekundärantikörpers, gefolgt von der Detektion über ein chemilumineszentes HRP-Substrat.

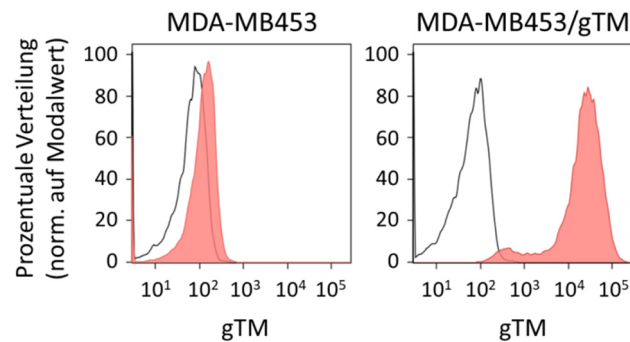
4.1.2 Natürliche und GD₂-spezifische Zytotoxizität von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen

Nach Generierung der GD₂-spezifischen CAR-Effektorzellen wurde deren zytotoxische Aktivität gegenüber Zielantigen-exprimierenden Tumorzellen überprüft. Hierzu wurden zunächst etablierte Zelllinien verschiedener Tumorentitäten hinsichtlich ihrer endogenen GD₂-Expression unter Verwendung eines PE-gekoppelten Antikörpers spezifisch für GD₂ getestet (siehe Abb. 4.4, A). Hierbei wiesen sowohl humane Tumorzelllinien neuroektodermalen Ursprungs wie die Melanomzelllinie SK-Mel-23 und die Neuroblastomzelllinie UKF-NB3 als auch die murine Lymphomzelllinie EL4 eine hohe Oberflächenexpression von GD₂ auf und konnten somit als geeignete Zielzellen zur Analyse der CAR-vermittelten Lyse herangezogen werden. Die erythroleukämische Zelllinie K562, die aufgrund der fehlenden Expression von MHC Klasse I-Molekülen für die Untersuchung der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen verwendet wird, erwies sich als GD₂-negativ [Gong et al., 1994; Lozzio und Lozzio, 1975]. Um den Beitrag des GD₂-spezifischen CARs direkt bestimmen und einen möglichen additiven Effekt der natürlichen Zytotoxizität ausschließen zu können, wurde zudem die NK-Zell-resistente, GD₂-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB453 mit einbezogen. Um eine CAR-vermittelte Lyse von MDA-MB453-Zellen zu ermöglichen, wurden diese mittels lentiviraler Transduktion mit einem membranständigen Derivat des anti-idiotypischen Antikörpers Ganglidiomab (gTM) modifiziert. Ganglidiomab bindet spezifisch an Varianten des 14.18-Antikörpers und interagiert somit auch mit den CARs hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15 (siehe Abb. 4.4, C) [Lode et al., 2013]. Das für die gTM-Expression eingesetzte lentivirale Konstrukt kodiert unter Kontrolle des SFFV-Promotors für ein scFv-Antikörperfragment des Antikörpers Ganglidiomab, welches an einen Myc-Tag, eine CD8α *hinge* und die CD28-Transmembrandomäne fusioniert ist. Es folgen eine IRES und die Sequenz des Markers eGFP (siehe Abb. 4.4, D). Die Herstellung VSV-G-pseudotypisierter lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T-Zellen wurde wie in 3.3.6 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden MDA-MB453-Zellen mit Viruspartikel-enthaltendem Überstand transduziert und mittels der eGFP-Expression durchflusszytometrisch sortiert (siehe 3.3.7 und 3.3.10). Die gTM-Expression eGFP-positiver MDA-MB453/gTM-Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch mit einem PE-gekoppelten GD₂-spezifischen Antikörper analysiert. Hierbei wurde eine hohe Oberflächenexpression des Ganglidiomab-Derivats festgestellt (siehe Abb. 4.4, B).

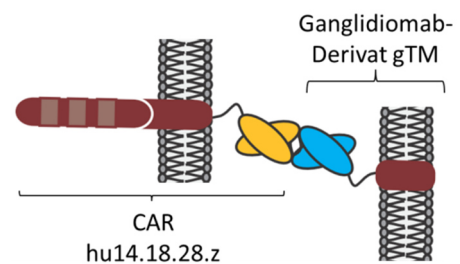
A



B



C



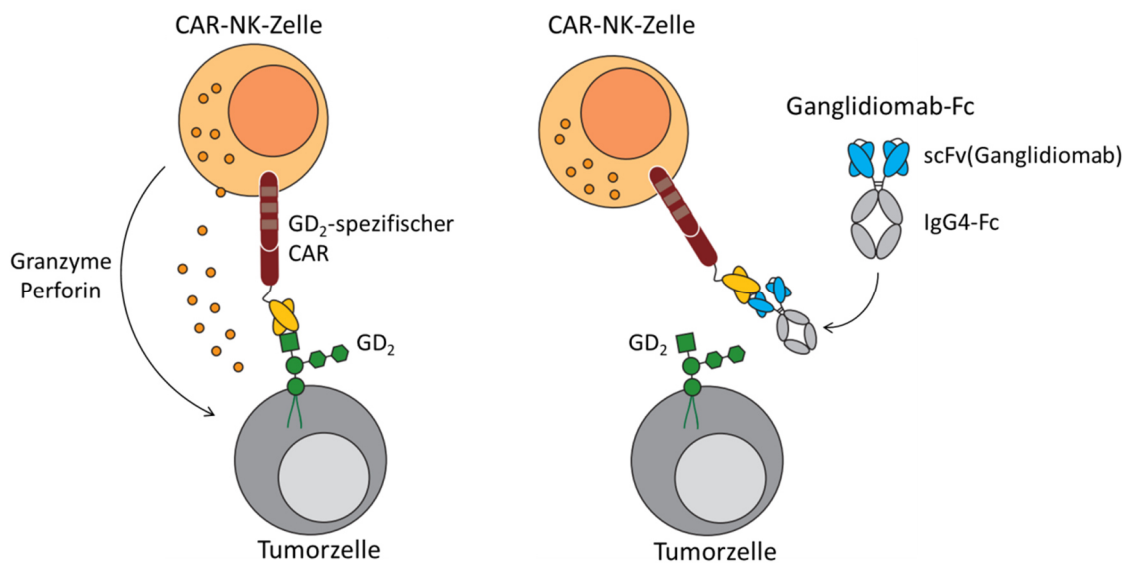
D



Abbildung 4.4: GD₂- und Gangliomab-exprimierende Zelllinien verschiedener Tumorentitäten. (A und B) Oberflächenexpression von endogenem GD₂ und des membranständigen Gangliomab-Derivats gTM auf murinen und humanen Tumorzelllinien. Die Oberflächenexpression wurde mit Hilfe eines PE-gekoppelten anti-GD₂-Antikörpers durchflusszytometrisch analysiert (rote Fläche). Ungefärbte Zellen (schwarze Linie) wurden als Kontrolle mitgeführt. **(C) Schematische Darstellung der Bindung des GD₂-spezifischen CARs an Gangliomab-exprimierende Zielzellen.** Der membrangebundene Gangliomab-Antikörper gTM wird von Derivaten der 14.18-Familie erkannt und kann somit spezifisch von den CARs hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15 über das scFv-Antikörperfragment hu14.18 gebunden werden. **(D) Schematische Darstellung des Konstrukts zur Expression eines membranständigen Derivats des 14.18-spezifischen anti-idiotypischen Antikörpers Gangliomab (gTM).** Für die Expression von gTM wurde das scFv-Antikörperfragment von Gangliomab in V_H-V_L-Orientierung in das lentivirale Transferplasmid pSIEW unter Kontrolle des SFFV-Promotors eingebracht. An den C-Terminus sind die Sequenzen eines Myc-Tag, einer Gelenkregion (*hinge*) und der Transmembrandomäne von CD28 fusioniert. Die gTM-Sequenz ist über eine IRES an die cDNA des eGFP-Markerproteins gekoppelt. SFFV: SFFV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, L: GS-Linker, M: Myc-Tag, *hinge*: Gelenkregion von CD8 α , IRES: *Internal ribosome entry site*, eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*.

Die Untersuchung der zytotoxischen Aktivität und Spezifität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen erfolgte mit Hilfe eines Wettbewerbsassays (siehe Abb. 4.5, A). Hierbei wird die Bindung des CARs an das entsprechende Antigen durch einen Antagonisten blockiert, was die Inhibierung der CAR-vermittelten Lyse Zielantigen-exprimierender Tumorzellen zur Folge hat. Als Kompetitor diente das Antikörperkonstrukt Ganglidiomab-Fc, bestehend aus einem 14.18-spezifischen, von Ganglidiomab abgeleiteten scFv-Antikörperfragment, welches über eine *hinge*-Region an eine IgG4-Fc-Domäne fusioniert ist. Der Fc-Teil besteht aus den konstanten Domänen CH₂ und CH₃ (siehe Abb. 4.5, B). Das durch das Fehlen der CH₁- und C_L-Domänen verkleinerte Konstrukt wird auch als Miniantikörper bezeichnet. Der Ganglidiomab-Fc Miniantikörper wurde in der Arbeitsgruppe generiert (Häcker et al., unveröffentlicht). Hierfür wurde die Sequenz scFv(Ganglidiomab)-Fc unter Kontrolle des CMV-Promotors in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 eingefügt. Es folgte die stabile Transfektion von HEK293-Zellen mit dem resultierenden Plasmid, die Expression des Miniantikörpers als sekretiertes Protein und die Aufreinigung aus dem Kulturüberstand (siehe 3.3.8).

A



B

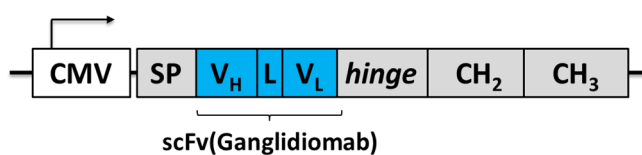


Abbildung 4.5: Kompetitiver Zytotoxizitätsassay zur Überprüfung der CAR-vermittelten Lyse GD₂-exprimierender Tumorzellen. (A) Funktionsprinzip des Wettbewerbsassays. Die Zugabe des Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers führt zu einer Blockade der Bindestelle des GD₂-spezifischen CARs und bewirkt die Inhibierung der CAR-vermittelten Tumorzelllyse. (B) Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsplasmids

Ergebnisse

pcDNA3-scFv(Ganglidiomab)-IgG4Fc. Unter Kontrolle des CMV-Promotors wird der Ganglidiomab-Fc Miniantikörper kodiert. Dieser besteht aus dem scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des Ganglidiomab-Antikörpers. Verbunden über eine *hinge*-Region folgen die konstanten Domänen CH_2 und CH_3 des humanen Immunglobulins G4 (IgG4). CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H : variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L : variable Domäne der leichten Antikörperkette, L: GS-Linker, *hinge*: Gelenkregion von CD8 α .

Zunächst wurde die Bindung des Ganglidiomab-Fc Antikörpers an GD₂-spezifische CAR-Effektorzellen überprüft (siehe Abb. 4.6). Hierfür wurden parentale und CAR-modifizierte NK-92-Zellen mit 12,5 nM des dimeren Miniantikörpers inkubiert und dessen Bindung durch die anschließende Inkubation mit einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für humanes IgG-Fc detektiert. Die darauf folgende durchflusszytometrische Analyse zeigte deutlich die Bindung des Antikörperkonstrukts an NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen, während parentale NK-92-Zellen erwartungsgemäß nicht gebunden wurden.

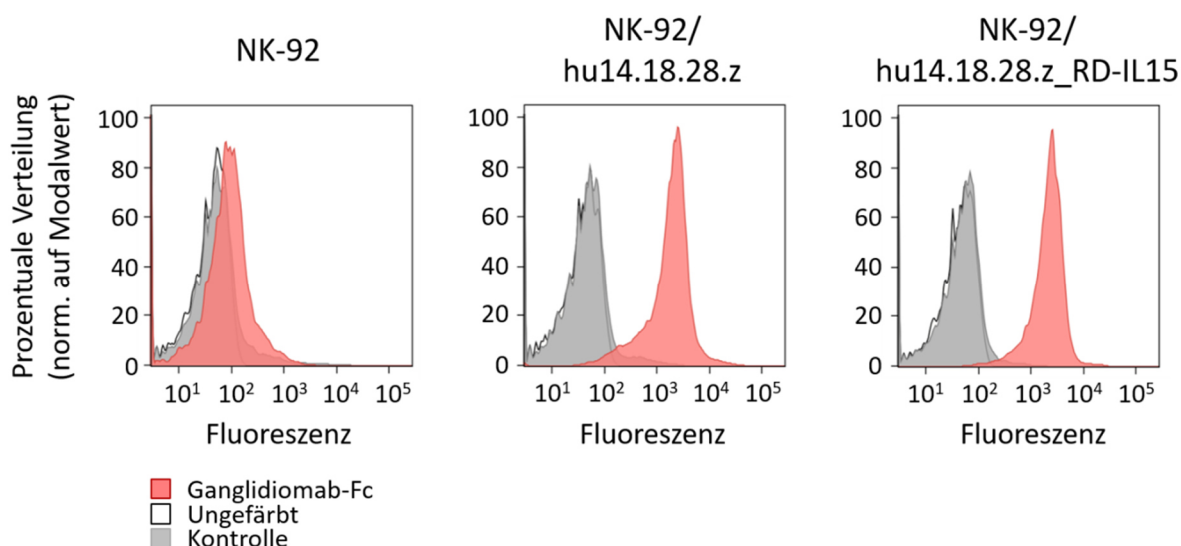


Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers an GD₂-spezifische CAR-Effektorzellen. NK-92/hu14.18.28.z und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 wurden mit dem Ganglidiomab-Fc Miniantikörper und einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für humanes IgG gefärbt (rote Fläche). Parentale NK-92-Zellen dienten als Negativkontrolle. Ungefärbte Zellen (schwarze Linie) und nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen (graue Fläche) wurden als Kontrollen mitgeführt.

Anschließend wurde der Zytotoxizitätsassay in parallelen Ansätzen in Gegenwart oder Abwesenheit des Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers durchgeführt, um bei der späteren Analyse den Beitrag der CAR-vermittelten Lyse quantifizieren zu können. Zunächst wurden Tumorzellen (Zielzellen) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein Violet (CV) gefärbt, um sie während der Auswertung mittels Durchflusszytometrie von NK-92-Zellen (Effektorzellen) unterscheiden zu können. Daraufhin wurden sie im Fall des kompetitiven Teilversuchs mit 12,5 nM des dimeren Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers

Ergebnisse

versetzt und mit parentalen oder CAR-NK-92-Zellen in unterschiedlichen Effektor (*Effector*)- zu Zielzell (*Target*) (E:T)-Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 vermischt. Nach einer Ko-Inkubation von 4 h bei 37 °C wurden die jeweiligen Ko-Kulturen pelletiert und kurz vor Analyse in Propidiumiodid (PI)-Lösung (1 µg/mL) zur Färbung toter Zellen aufgenommen. Der Anteil lysierter Tumorzellen wurde anhand der CV- und PI-doppelt-positiven Population durchflusszytometrisch quantifiziert (siehe Abb. 4.7, A).

Zunächst wurde die natürliche Zytotoxizität parentaler und CAR-NK-92-Zellen gegenüber K562 untersucht. Die mittels FACS-Analyse erhaltenen Ergebnisse zeigten hierbei eine vergleichbar hohe spezifische Lyse von K562 durch die jeweiligen Effektorzelllinien (siehe Abb. 4.7, B). Bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 lysierten parentale NK-92-Zellen durchschnittlich $63,9 \% \pm 2,3 \%$ der K562-Zellen, während der Anteil lysierter Zielzellen im Fall von NK-92/hu14.18.28.z $57,8 \% \pm 6,1 \%$ und bei NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 $63,2 \% \pm 4,9 \%$ betrug. Auch bei einem E:T-Verhältnis von 5:1 und 1:1 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen parentalen und modifizierten NK-92-Zellen. Ein möglicher Einfluss des Kompetitors auf die natürliche Zytotoxizität der GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen konnte ausgeschlossen werden, da die spezifische Lyse von K562 durch NK-92/hu14.18.28.z ($53,5 \% \pm 3,8 \%$) und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 ($62,3 \% \pm 2,2 \%$) in Anwesenheit des Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers unverändert blieb.

Für die Analyse der CAR-vermittelten Zytotoxizität wurden die GD₂-exprimierenden Tumorzelllinien SK-Mel-23, UKF-NB3, EL4 und Ganglidiomab-exprimierende MDA-MB453/gTM-Zellen eingesetzt. SK-Mel-23-Zellen wurde bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 nur zu einem sehr geringen Anteil von parentalen NK-92-Zellen lysiert ($0,9 \% \pm 4,6 \%$), wohingegen sich die Population PI-positiver Zellen nach Ko-Kultivierung mit CAR-modifizierten Zellen ohne ($30,9 \% \pm 8,4 \%$) oder mit ektopischer RD-IL15-Expression ($35,1 \% \pm 1,4 \%$) signifikant erhöhte. UKF-NB3-Zellen wurden von unmodifizierten NK-92-Zellen bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 zu $28,6 \% \pm 1,3 \%$ lysiert, zeigten jedoch ebenfalls eine erhöhte spezifische Lyse durch NK-92/hu14.18.28.z ($63,8 \% \pm 1,7 \%$) und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 ($59,1 \% \pm 0,6 \%$). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit der murinen Lymphom-Zelllinie EL4 erhalten, deren Lyse durch parentale NK-92-Zellen $5,4 \% \pm 0,9 \%$ (E:T = 10:1) betrug. Die Expression der jeweiligen CARs hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15 führte zu einer signifikanten Steigerung der spezifischen Lyse, die sich bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 in einem prozentualen Anteil PI-positiver Zellen von $73,8 \% \pm 0,7 \%$ beziehungsweise $74,3 \% \pm 3,2 \%$ äußerte. Auch bei geringeren E:T-Verhältnissen wurden deutliche Unterschiede zu parentalen NK-92 festgestellt.

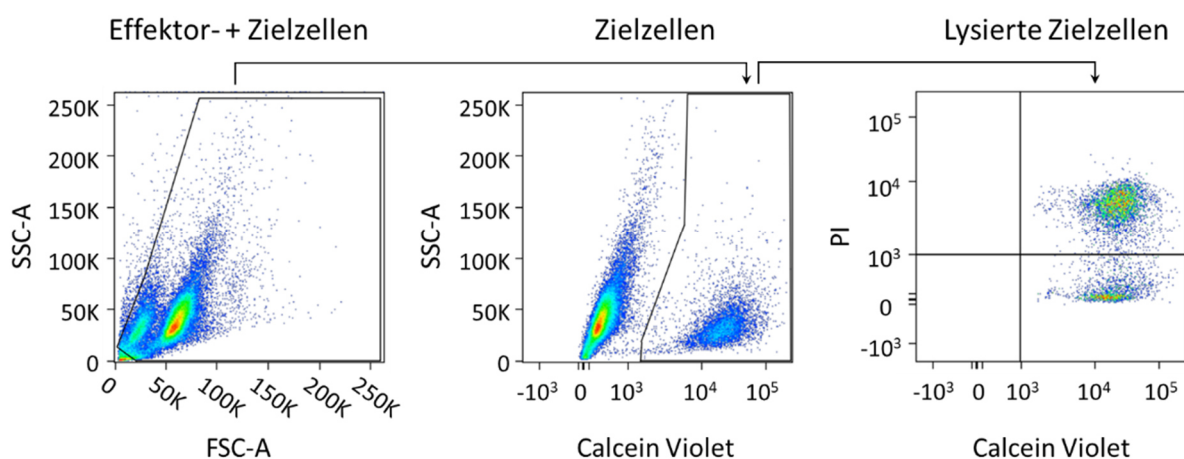
Überdies wurde ein Zytotoxizitätsassay mit der NK-Zell-resistenten Zelllinie MDA-MB453 durchgeführt, wobei diese erwartungsgemäß nur in geringem Maße von nicht transduzierten

Ergebnisse

(11,8 % ± 2,2 %; E:T = 10:1) und CAR-modifizierten NK-92-Zellen (13,3 % ± 3,1 % beziehungsweise 4,8 % ± 3,7 %; E:T = 10:1) lysiert wurde. Die Expression des Ganglidiomab-Derivats auf MDA-MB453/gTM-Zellen führte dagegen zu einer gesteigerten CAR-vermittelten Lyse, welche sich bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 in einem Anteil lysierter Zellen von 56,2 % ± 1,1 % (NK-92/hu14.18.28.z) beziehungsweise 63,0 % ± 0,9 % (NK-92/hu14.18.28.z-RD-IL15) zeigte, während die natürliche Zytotoxizität parentaler NK-92 niedrig blieb (- 4,3 % ± 2,1 %).

In den Konkurrenzexperimenten mit Ganglidiomab-Fc konnte die erhöhte Zytotoxizität CAR-modifizierter NK-92-Zellen gegenüber GD₂-exprimierenden Zielzellen blockiert und auf das Niveau der natürlichen Zytotoxizität parentaler NK-92-Zellen herabgesenkt werden. So reduzierte sich der Anteil PI-positiver Tumorzellen nach den jeweiligen Ko-Kultivierungen mit NK-92/hu14.18.28.z und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 im Fall von SK-Mel-23-Zellen auf 0,4 % ± 0,3 % beziehungsweise 10,7 % ± 1,4 %. UKF-NB3-Zellen wurden nur noch zu jeweils 26,0 % ± 2,0 % und 25,8 % ± 2,4 % und EL4-Zellen zu 7,7 % ± 3,3 % und 5,6 % ± 3,9 % lysiert. Die Hemmung der CAR-Aktivität durch den Miniantikörper wurde auch bei geringeren E:T-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 aufrecht erhalten. Die Anwesenheit des Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers führte auch zu einer Reduktion der CAR-vermittelten Lyse von MDA-MB453/gTM-Zellen und war bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 annähernd vergleichbar zur natürlichen Zytotoxizität parentaler NK-92-Zellen (2,9 % ± 0,3 % bei NK-92/hu14.18.28.z beziehungsweise 7,1 % ± 3,4 % bei NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15; E:T = 10:1).

A



Ergebnisse

B

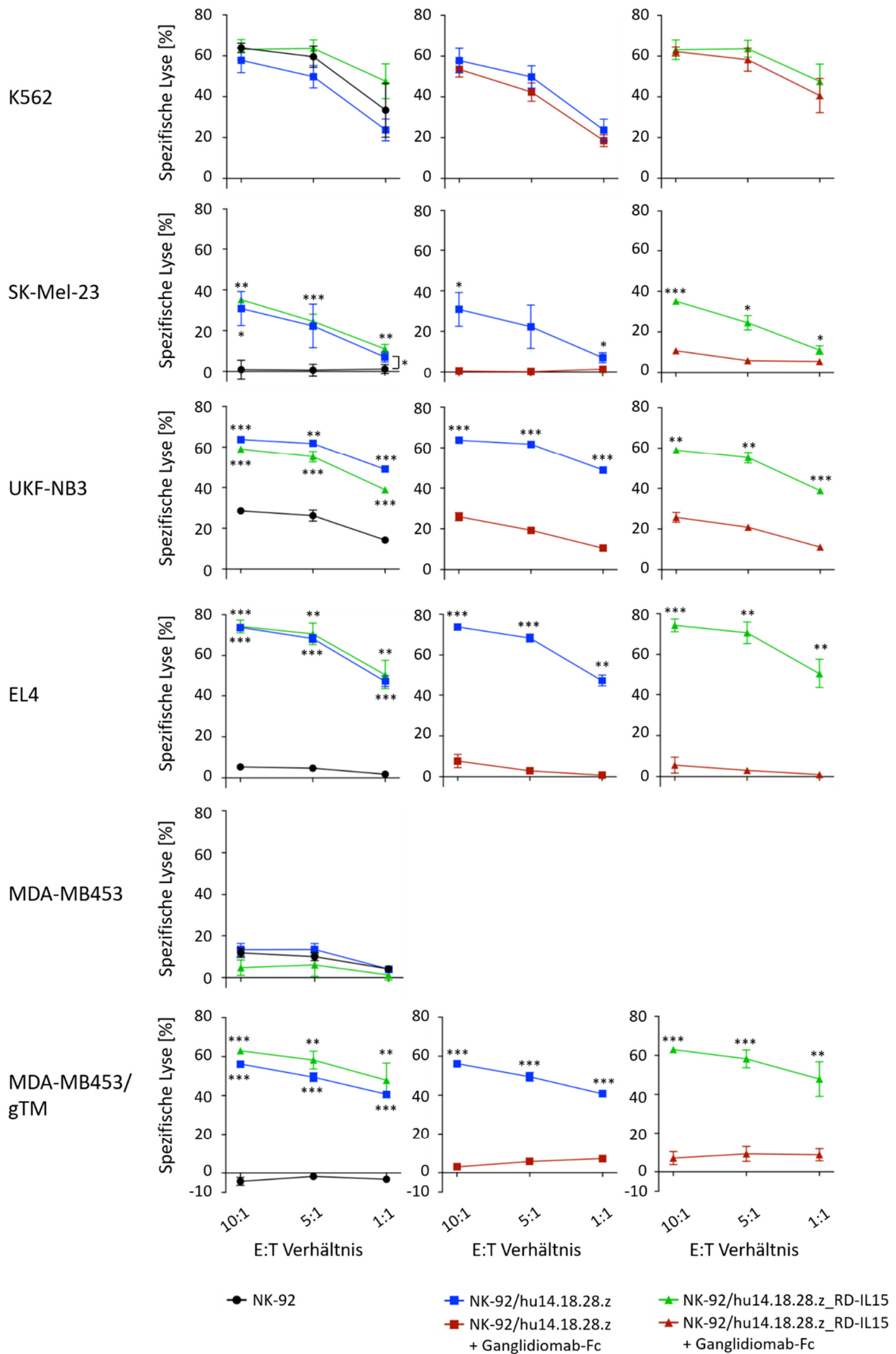


Abbildung 4.7: Analyse der Zytotoxizität parentaler und GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen gegenüber etablierten Tumorzelllinien. Parentale und CAR-NK-92-Zellen wurden mit GD₂-negativen und CAR-Antigen-exprimierenden Tumorzellen in den angegebenen Effektor- zu Zielzell- (E:T) Verhältnissen vermischt und für 4 h bei 37 °C in An- oder Abwesenheit von 12,5 nM des dimeren Ganglidiomab-Fc Miniantikörpers ko-kultiviert. Anschließend wurde die spezifische Lyse durchflusszytometrisch analysiert. **(A) Gating-Strategie eines durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays.** Mittels der Calcein Violet (CV)-Färbung wurden Zielzellen durchflusszytometrisch im Pacific Blue-Kanal identifiziert. Im Anschluss wurde hiervon der prozentuale Anteil lysierter Tumorzellen anhand der PI (Propidiumiodid)-Färbung im PE-Kanal bestimmt. **(B) Untersuchung der natürlichen und CAR-vermittelten Lyse von GD₂- und Ganglidiomab-exprimierenden Zielzellen unter Einfluss eines Kompetitors.** Die spezifische Lyse wurde durch Abzug der spontanen Lyse der jeweiligen Tumorzelllinie berechnet, welche sich aus dem Anteil toter Zielzellen ohne Ko-Kultivierung mit Effektorzellen ergibt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Experimenten. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

In einem weiteren Experiment wurde zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Lyse GD₂-exprimierender Tumorzellen durch CAR-NK-92-Zellen eine Zeitraffer-Mikroskopie durchgeführt (siehe Abb. 4.8). Hierfür wurden UKF-NB3-Zellen mit CellTrace™ Far Red gefärbt und in einem E:T-Verhältnis von 5:1 mit CFSE-markierten NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen vermischt. Nach Zugabe des NucView® 405 Caspase-3-Substrats, welches sich aus einem DNA-Farbstoff und der Caspase-3-Erkennungssequenz DEVD zusammensetzt und zunächst als nicht fluoreszierendes Molekül im Zytoplasma von Effektor- und Tumorzellen verbleibt, erfolgte eine 4-stündige Ko-Inkubation. Bei Zelllyse kommt es in der späten Phase der Apoptose zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7, welche zur Spaltung der DEVD-Sequenz und der anschließenden Bindung des Farbstoffs an die DNA führt. Über die hierbei entstehende Fluoreszenz können lysierte Zellen identifiziert werden. In dem gewählten Abschnitt der mikroskopischen Aufnahme wurde die beginnende Apoptose von UKF-NB3-Zellen nach einer 3- bis 4-stündigen Ko-Kultivierung mit CAR-NK-92-Zellen nachgewiesen, welche sich deutlich durch die Bildung von Bläschen (*Blebbing*) an der Zellmembran zeigte. Es wurde ebenfalls eine blaue Verfärbung CFSE-positiver NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nach deren Interaktion mit Tumorzellen beobachtet. Dies lässt sich durch die in den zytotoxischen Granula von NK-92-Zellen vorhandene Serinprotease Granzym B (GrB) erklären, welche ebenso wie Caspase 3 und 7 in der Lage ist, die DEVD-Sequenz des Caspase-3-Substrats zu erkennen und zu spalten [Andrade et al., 1998]. Der Farbumschlag bildete sich in NK-Zellen jedoch nach erfolgter Tumorzelllyse zurück, was auf das Überleben der Effektorzellen hindeutet.

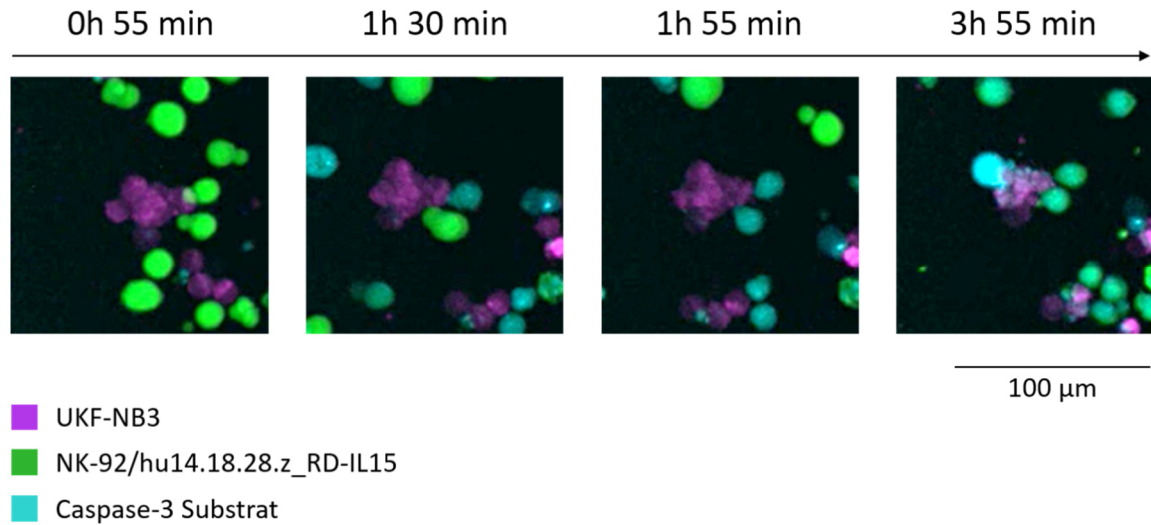


Abbildung 4.8: Zeitraffer-Mikroskopie der Lyse von UKF-NB3-Zellen durch CAR-NK-92-Zellen. CFSE-gefärbte NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen (grün) wurden mit Far Red-gefärbten UKF-NB3-Zellen (lila) in einem Effektor- zu Zielzell- (E:T) Verhältnis von 5:1 vermischt. Anschließend wurde die Ko-Kultur mit NucView® 405 Caspase-3-Substrat in einer Verdünnung von 1:200 versetzt und für 4 h mikroskopisch analysiert. Hierbei wurden apoptotische Zellen über den Nachweis der Caspase-3/7-Aktivität und der anschließenden Färbung ihrer DNA (blau) identifiziert. Vergrößerung: 20x.

4.1.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2

In den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Experimenten wurden NK-92-Zellen mit den GD₂-spezifischen CARs hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15 transduziert und über eine Durchflusszytometrie-basierte Zellsortierung zu einer homogenen Zellpopulation von bis zu 94,4 % eGFP-positiven, CAR-exprimierenden NK-92-Zellen angereichert. Mittels Immunoblot-Analyse konnten beide CAR-Konstrukte auf Proteinebene nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde die Funktionalität der GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen gegenüber Zielantigen-exprimierenden Zelllinien verschiedener Tumorentitäten *in vitro* getestet. Hierbei konnte eine vergleichbar hohe CAR-vermittelte Zytotoxizität sowohl von NK-92/hu14.18.28.z- als auch NK-92/hu14.18.28.z_RDIL-15-Zellen festgestellt werden, welche durch Zugabe des 14.18-spezifischen Kompetitors Ganglidiomab-Fc aufgehoben wurde. Die Kinetik der Lyse GD₂-exprimierender Tumorzellen wurde beispielhaft mit NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 und der Neuroblastomzelllinie UKF-NB3 mittels Zeitraffer-Mikroskopie veranschaulicht. Dies bestätigte die Zielzellyse durch Induktion von Apoptose.

4.2 Expressionsanalyse von RD-IL15 und funktionelle Charakterisierung Zytokin-exprimierender CAR-NK-92-Zellen

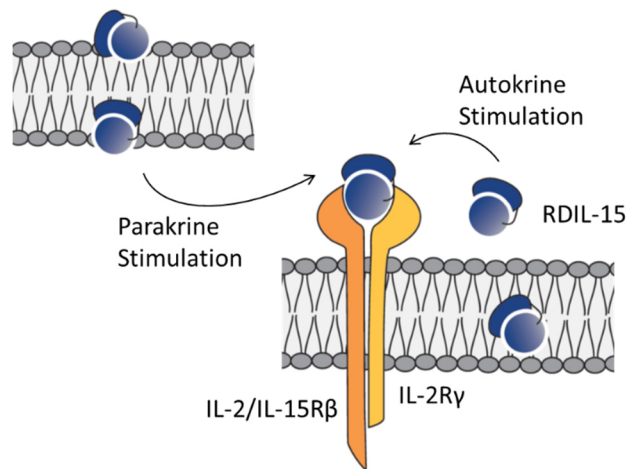
4.2.1 Ektopische Expression des IL-15-Superagonisten RD-IL15 in GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen

IL-15 ist wie IL-2 Teil der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten Zytokin-Familie und spielt eine entscheidende Rolle für die Differenzierung, Langlebigkeit, Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen [Fehniger und Caligiuri, 2001]. In vorangegangenen Analysen wiesen NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen eine vergleichbare zytotoxische Aktivität gegenüber Zielantigen-exprimierenden Tumorzellen auf (siehe Abb. 4.7). Die Integration des IL-15-Superagonisten in das GD₂-spezifische CAR hu14.18.28.z-Konstrukt kann hierbei einen entscheidenden Beitrag zu einer andauernden Antitumoraktivität von CAR-NK-92-Zellen mit gesteigertem Wachstumsverhalten leisten. Entsprechend wurde in nachfolgenden Experimenten ein möglicher stimulierender Effekt von ektopisch exprimiertem RD-IL15 in NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen untersucht.

Hierfür wurde zunächst die Expression des IL-15-Superagonisten in NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen überprüft. Der über IL-15 vermittelte Signalweg wird natürlicherweise über die intrazelluläre Bildung des IL-15/IL-15R α -Komplexes und dessen Transport an die Zelloberfläche initiiert. Dessen anschließende Bindung erfolgt entweder an die Rezeptorketten IL-2/IL-15R β und γ c (*Common γ chain*) benachbarter Immunzellen (parakrine Stimulation) oder derselben Zelle (autokrine Stimulation) [Stonier und Schluns, 2010]. Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus auch bei RD-IL15 vorliegt, wurde die Sekretion des IL-15-Superagonisten und dessen Bindung an die β/γ -Rezeptorketten auf NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen analysiert (siehe Abb. 4.9, A). Hierfür wurden jeweils 1×10^6 parentale NK-92- als Negativkontrolle und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen mit einem Antikörper spezifisch für humanes IL-15 gefärbt. Als Positivkontrolle dienten IL-15R α -exprimierende Raji-Zellen, die zunächst mit rekombinantem humanem IL-15 und anschließend ebenfalls mit dem huIL-15-spezifischen Antikörper inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden die jeweiligen Proben mit einem Spezies-spezifischen, AF647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abb. 4.9, B). Die Analysen zeigten hierbei eine spezifische Bindung des IL-15-Superagonisten auf der Oberfläche von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen, die der von mit huIL-15 inkubierten Raji-Zellen vergleichbar war. Im Gegensatz hierzu konnte keine Bindung des anti-IL15 Antikörpers an unbehandelte Raji- und NK-92-Zellen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

A



B

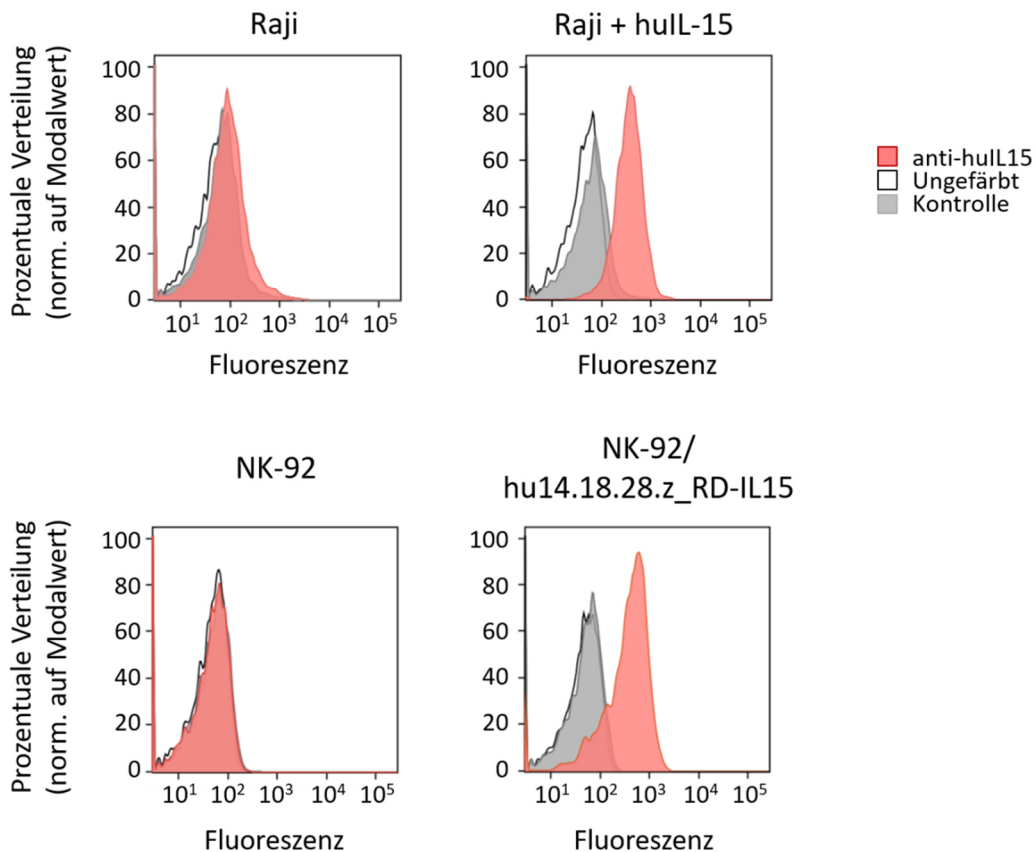


Abbildung 4.9: Nachweis der Bindung von RD-IL15 an die Oberfläche von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15. (A) Schematische Darstellung der autokrinen und parakrinen Stimulation durch den IL-15-Superagonisten. Sekretiertes RD-IL15 bindet an die Rezeptorketten IL-2/IL-15R β und γ c und kann hierbei auf dieselbe (autokrin) oder eine benachbarte Zelle (parakrin) wirken. **(B) Durchflusszytometrische Analyse der RD-IL15-Expression und Bindung an die Produzentenzellen.** Zur Detektion der Oberflächenexpression von RD-IL15 auf NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurden IL-15R α -positive Raji-Zellen als Positivkontrolle hinzugezogen. Diese wurden zunächst mit rekombinantem humanem IL-15 inkubiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15- und vorinkubierten Raji-Zellen mit einem huIL-15-spezifischen Antikörper und einem Spezies-spezifischen, AF647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (rote Fläche). Parentale NK-92-Zellen und nicht vorinkubierte Raji-Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle. Ungefärbte

Zellen (schwarze Linie) und nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen (graue Fläche) wurden als Kontrollen mitgeführt.

4.2.2 Autokrine Aktivierung von CAR-NK-92-Zellen durch RD-IL15

Nach dem Nachweis der Bindung des IL-15-Superagonisten an die Oberfläche von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde ein möglicher autokriner Effekt auf die Zytokin-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen untersucht. IL-15 und IL-2 gehören zur gemeinsamen gamma-Rezeptorketten Zytokin-Familie und binden beide an die gleichen Rezeptor-Untereinheiten γ c und IL-2/IL15R β (siehe Abb. 4.10, A). Gebunden an ihre jeweilige α -Kette führt die Interaktion der Zytokine mit den gemeinsamen Rezeptorketten β und γ zur Anlagerung und Phosphorylierung der Kinasen JAK1 beziehungsweise JAK3. Diese induzieren wiederum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 [Imada und Leonard, 2000]. So kann mittels der Untersuchung von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) nach Bindung von RD-IL15 an den entsprechenden Rezeptorkomplex die darauf folgende Aktivierung des IL-15-Signalwegs nachgewiesen werden.

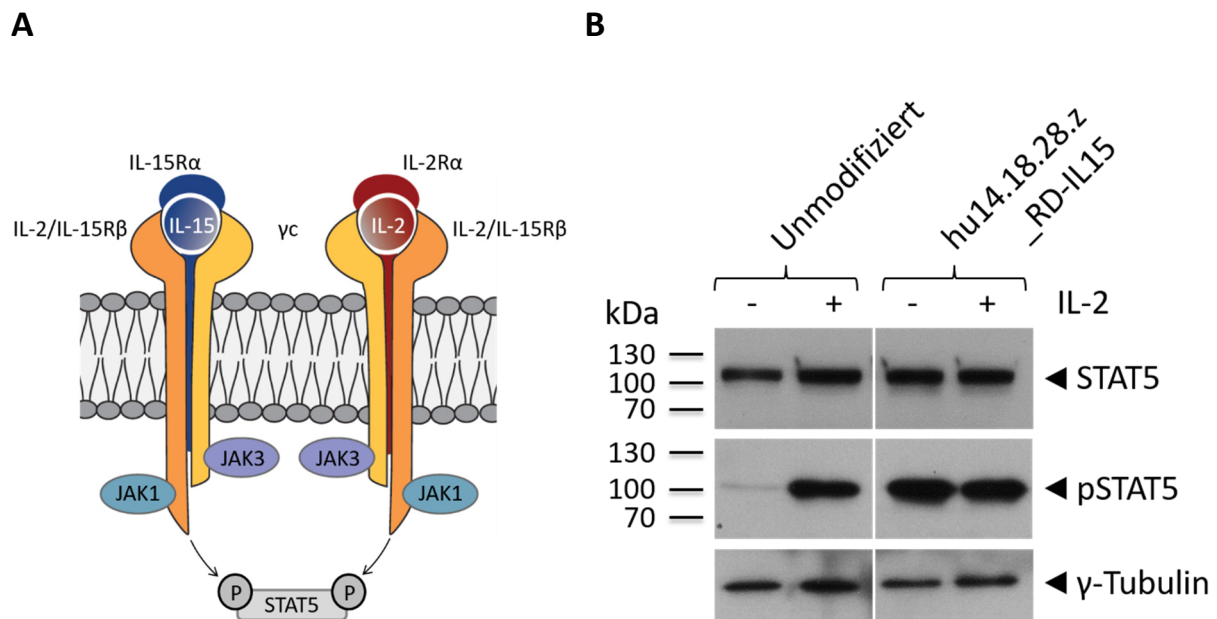


Abbildung 4.10: Untersuchung der autokrinen Stimulation RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen. (A) Schematische Darstellung der STAT5-Aktivierung. Die Bindung von IL-2 und IL-15 an ihre entsprechende α -Rezeptorkette und die gemeinsamen β/γ -Rezeptor-Untereinheiten induziert die Aktivierung der Kinasen JAK1 beziehungsweise JAK3 und die anschließende Phosphorylierung von STAT5. **(B) Einfluss des Superagonisten auf die Bildung von phosphoryliertem STAT5 in CAR-NK-92-Zellen.** Parentale und RD-IL15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen wurden für 24 h in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert und anschließend lysiert. 30 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Zelllysate wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Immunoblot mittels spezifischer Primärantikörper für STAT5 und pSTAT analysiert. Als Ladekontrolle diente ein γ -Tubulin-spezifischer Antikörper. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mittels eines Spezies-spezifischen, HRP-markierten Sekundärantikörpers, gefolgt von der Detektion über ein chemilumineszentes HRP-Substrat.

Hierfür wurden RD-IL15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen und parentale NK-92-Zellen als Kontrolle für 24 h in IL-2-haltigem oder IL-2-freiem X-Vivo⁺ Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die einzelnen Proben zur Herstellung von Zelllysaten geerntet und mittels Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen STAT5, pSTAT5 und γ -Tubulin analysiert (siehe Abb. 4.10, B). Wie erwartet wiesen parentale und RD-IL-15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen nach Kultivierung in IL-2-haltigem Medium eine spezifische Bande für phosphoryliertes STAT5 (≈ 90 kDa) auf. Nach 24-stündigem IL-2-Entzug zeigte sich bei parental NK-92-Zellen eine starke Reduzierung von aktiviertem STAT5, wohingegen in den Lysaten von RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen weiterhin eine deutliche pSTAT-Proteinbande zu sehen war. Der IL-15-Superagonist erwies sich hiermit als funktional und zeigte eine mit exogenem IL-2 vergleichbar hohe Aktivität. Dies belegt die autokrine Stimulation von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen durch RD-IL15 und dessen Aktivierung des IL-15-induzierten Signalwegs in CAR-NK-92-Zellen.

4.2.3 Einfluss der RD-IL15-Expression auf die Proliferation und zytotoxische Aktivität genmodifizierter NK-92-Zellen

IL-15 ist neben IL-2 unerlässlich für das Wachstum von NK-Zellen [Becknell und Caligiuri, 2005]. Die im vorherigen Abschnitt nachgewiesene STAT5-Aktivierung weist darauf hin, dass ein IL-2-Defizit durch die ektopische Expression von RD-IL15 kompensiert werden kann. In den nachfolgenden Experimenten wurde der immunmodulatorische Effekt des IL-15-Superagonisten im Hinblick auf die Proliferation und Viabilität von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen in Abwesenheit von exogenem IL-2 weiter untersucht.

Hierfür wurde ein Proliferationsassay mit CAR-NK-92-Zellen mit oder ohne ektopische RD-IL15-Expression sowie CAR-negativen parental NK-92-Zellen durchgeführt. Pro Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 1 ml X-Vivo⁺ Medium mit oder ohne IL-2 ausgesät und für 7 Tage kultiviert (siehe Abb. 4.11). An Tag 1, 4 und 7 wurden je 10 μ l der Zellsuspension abgenommen, um mit Hilfe des Zellzählungs-Gerätes Countess II unter Verwendung einer Trypanblau-Lösung die Dichte der Zellen/ml und ihre Viabilität zu bestimmen. Das abgenommene Volumen wurde mit dem entsprechenden Medium wieder aufgefüllt. Die Kultivierung in Kompletmedium mit IL-2 führte im Fall der drei Effektorzelllinien erwartungsgemäß zu einer konstanten Proliferation. Parentale NK-92-Zellen erreichten an Tag 7 eine durchschnittlichen Dichte von $98,5 \times 10^4 \pm 10,2 \times 10^4$ Zellen/ml. Verglichen hierzu zeigten CAR-NK-92-Zellen eine erhöhte Wachstumsrate, die sich in Gegenwart von RD-IL15 weiter verstärkte. Hierbei belief sich die Dichte im Fall von NK-92/hu14.18.28.z auf $133,7 \times 10^4 \pm 26,3 \times 10^4$ Zellen/ml und von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 auf $178,7 \times 10^4 \pm 40,9 \times 10^4$ Zellen/ml. Der prozentuale Anteil lebender Zellen blieb hierbei weitgehend konstant. Eine 7-tägige IL-

Ergebnisse

2-Depletion führte bei parentalen und CAR-modifizierten NK-92-Zellen ohne RD-IL15 ab Tag 1 zu einer Abnahme der Zellzahl, die bei der Endpunktanalyse an Tag 7 $9,1 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$ Zellen/ml beziehungsweise $12,9 \times 10^4 \pm 6,1 \times 10^4$ Zellen/ml betrug und von einer verminderten Viabilität begleitet wurde ($31,7 \% \pm 13,7 \%$ beziehungsweise $25,0 \% \pm 9,2 \%$). Dagegen betrug die Zelldichte RD-IL15 exprimierender CAR-NK-92-Zellen mit einer etwas geringeren Proliferationsrate in IL-2-freiem Medium verglichen zur Kultivierung in Kompletmedium an Tag 7 $120,0 \times 10^4 \pm 14,8 \times 10^4$ Zellen/ml. Im Hinblick auf deren Viabilität zeigte die Kultivierung in An- und Abwesenheit von exogenem IL-2 keinen signifikanten Unterschied beim Anteil lebensfähiger Zellen.

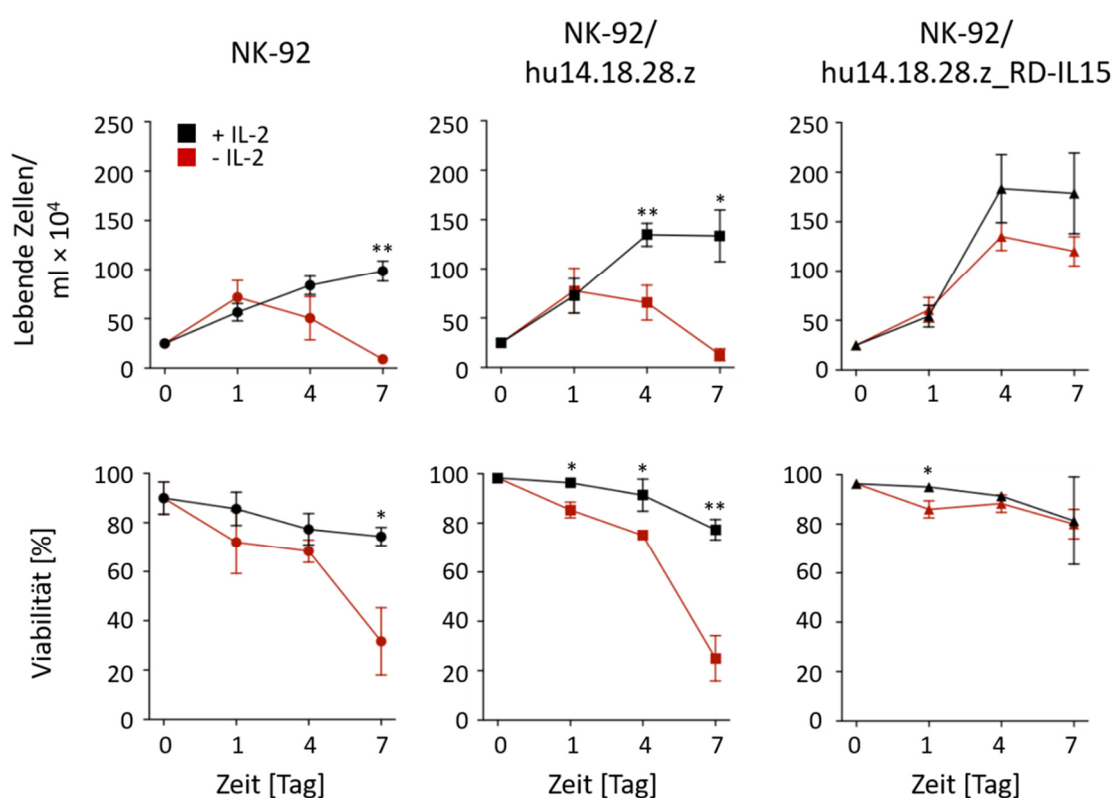


Abbildung 4.11: Proliferationsverhalten und Viabilität Zytokin-sekretierender CAR-NK-92-Zellen nach IL-2-Depletion. Parentale und CAR-modifizierte NK-92-Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 7 Tage in X-Vivo⁺⁺ Kompletmedium (schwarze Linie) oder IL-2-depletiertem X-Vivo⁺ Medium (rote Linie) kultiviert. An Tag 1, 4 und 7 wurden Zellzahl und Viabilität bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass die zuvor gezeigte autokrine Stimulation durch den IL-15-Superagonisten ausreichend ist, um nach IL-2-Depletion Wachstum und Überleben von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen aufrecht zu erhalten.

Dies lässt vermuten, dass sich in einer heterogenen NK-92-Zellpopulation aus nicht transduzierten NK-92-Zellen und RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen Letztere in IL-2-defizientem

Ergebnisse

Kultivierungsmedium anreichern könnten, was zu einer homogenen Population von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen führen würde. Um dies zu überprüfen, wurden NK-92-Zellen mit VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Viruspartikeln (siehe 3.3.6) kodierend für hu14.18.28.z_RD-IL15 transduziert (siehe 3.3.7) und anschließend in IL-2 freiem Medium kultiviert. Ab Tag 7 wurde der prozentuale Anteil modifizierter Zellen anhand der Expression des Markerproteins eGFP durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 4.12). Die Analyse erfolgte einmal wöchentlich, wobei der Anteil eGFP-positiver NK-92-Zellen stetig zunahm. Ab Tag 48 wurde ein Plateau von 84 % bis 85 % eGFP-positiver NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen erreicht.

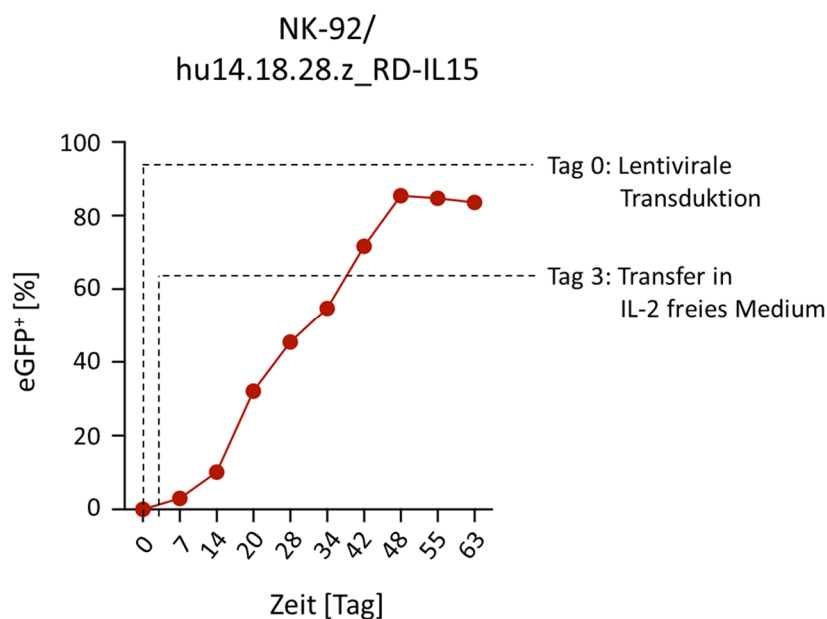


Abbildung 4.12: Selbstanreicherung RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen. Ab Tag 3 nach Transduktion wurde die heterogene Kultur aus nicht transduzierten und modifizierten NK-92-Zellen in IL-2-freiem X-Vivo⁺ kultiviert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen anhand ihrer eGFP-Expression einmal wöchentlich durchflusszytometrisch bestimmt.

Eine homogene Zellpopulation von 100 % modifizierter Zellen wurde hierbei nicht erzielt. Dies deutet darauf hin, dass ab einem Anteil von etwa 85 % transduzierter NK-92-Zellen RD-IL15 in ausreichender Menge exprimiert und in den Überstand sekretiert wird, um umgebende, nicht modifizierte Zellen parakrin mit zu stimulieren.

NK-92-Zellen stammen aus einem Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten. Daher werden die Zellen vor Injektion im Rahmen klinischer Studien einer Bestrahlung von 10 Gy unterzogen [Arai et al., 2008]. Durch diese Vorsichtsmaßnahme soll die mögliche Bildung eines sekundären Lymphoms vermieden werden. In vorangegangenen *in vitro* Analysen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass

Ergebnisse

die Bestrahlung von ErbB2-spezifischen CAR-NK-92-Zellen mit 10 Gy zu einer sukzessiven Abnahme lebensfähiger NK-92-Zellen führt und ab Tag 5 nach Bestrahlung keine lebensfähigen Zellen mehr nachweisbar sind [Schönfeld et al., 2015]. Wie zuvor gezeigt, weisen NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen eine gesteigerte Wachstumsrate und Viabilität auf. In einem weiteren Ansatz wurde nun ein möglicher Einfluss des IL-15-Superagonisten auf die Proliferation der Zytokin-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung überprüft. Hierfür wurden parentale und CAR-NK-92-Zellen ohne beziehungsweise mit ektopischer RD-IL15-Expression in X-Vivo⁺⁺ Medium aufgenommen, mit 10 Gy bestrahlt und anschließend für 11 Tage kultiviert. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen (siehe Abb. 4.13).

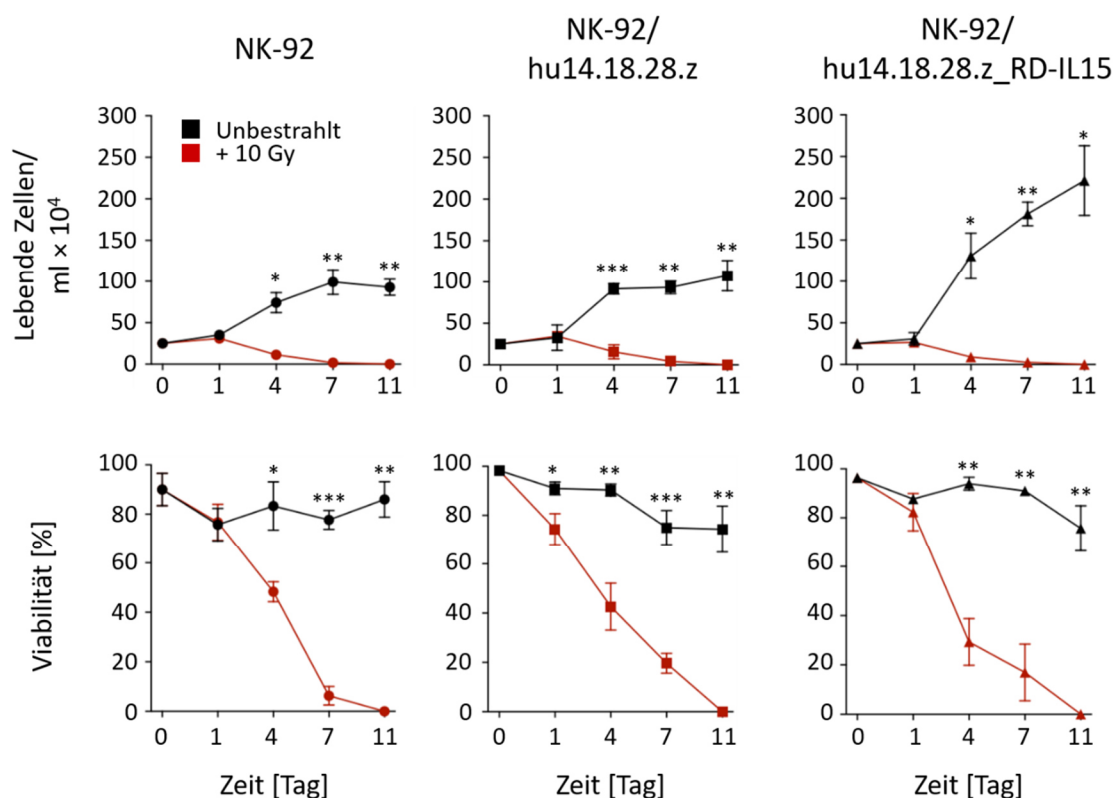


Abbildung 4.13: Proliferationsverhalten und Viabilität Zytokin-sekretierender CAR-NK-92-Zellen nach Bestrahlung. Sowohl parentale sowie modifizierte NK-92-Zellen wurden unbestrahlt (schwarze Linie) oder nach Bestrahlung mit 10 Gy (rote Linie) in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 11 Tage in X-Vivo⁺⁺ Medium kultiviert. An Tag 1, 4, 7 und 11 wurden Zellzahl und Viabilität bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Die Zelldichte wurde an Tag 1, 4, 7 und 11 bestimmt. Wie im zuvor gezeigten Proliferationsexperiment wiesen parentale und CAR-NK-92-Zellen in Kompletmedium eine konstante Wachstumsrate auf. Diese zeigte sich in vergleichbaren Zelldichten parentaler NK-92 und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen von $92,9 \times 10^4 \pm 9,9 \times 10^4$ beziehungsweise $107,7 \times 10^4 \pm 18,5 \times 10^4$

Ergebnisse

Zellen/ml an Tag 11. RD-IL15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen hingegen wiesen eine erhöhte Proliferation auf, welche sich in einer Zelldichte von $221,3 \times 10^4 \pm 41,8 \times 10^4$ Zellen/ml äußerte. Die Viabilität der drei NK-92-Gruppen blieb über die Dauer des Experiments konstant. Eine Bestrahlung hingegen führte zu einem signifikanten Rückgang lebensfähiger Zellen, so dass ab Tag 11 unabhängig von der RD-IL15-Expression weder parentale noch modifizierte NK-92-Zellen detektierbar waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei einem potenziellen Einsatz im Patienten die Expression des IL-15-Superagonisten zu keinem Überlebensvorteil bestrahlter NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen führt und diese ein vergleichbar sicheres Zellprodukt für die adoptive Immuntherapie darstellen wie NK-92-Zellen ohne RD-IL15-Expression.

Die Ergebnisse der Proliferationsexperimente bestätigen den autokrinen Effekt des IL-15-Superagonisten auf CAR-NK-92-Zellen, deren Überleben und Proliferation dadurch auch in IL-2-freiem Medium bestehen bleibt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch die natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen nach Kultivierung in IL-2-freiem Medium aufrecht erhalten wird. Hierfür wurden parentale NK-92- und NK-92/hu14.18.28_RD-IL15-Zellen in IL-2-freiem X-Vivo⁺ kultiviert. An Tag 3 wurden die Effektorzellen entweder mit der GD₂-negativen Tumorzelllinie K562 oder der GD₂-positiven Melanomzelllinie SK-Mel-23 in E:T-Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 vermischt (siehe Abb. 4.14). Es folgte eine 4-stündige Ko-Inkubation in Abwesenheit von IL-2. Parentale und CAR-NK-92-Zellen, die durchgehend in IL-2-haltigem Medium kultiviert wurden, wurden in einem parallelen Ansatz als Kontrolle mitgeführt und für 4 h in Anwesenheit von IL-2 mit den jeweiligen Zielzelllinien ko-kultiviert. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse zeigte eine signifikante Abnahme der natürlichen Zytotoxizität parentaler NK-92-Zellen gegenüber K562 nach Kultivierung in IL-2-freiem Medium. Diese sank bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 von $71,2 \% \pm 0,3 \%$ auf $21,0 \% \pm 3,1 \%$. Ebenso wurde eine verringerte Lyse von SK-Mel-23 durch parentale NK-92-Zellen festgestellt. Während die Zielzellen in Gegenwart von IL-2 zu $10,9 \% \pm 7,7 \%$ lysiert wurden, reduzierte sich der Anteil lysierter Zellen in IL-2-freiem Medium auf $1,4 \% \pm 1,8 \%$ (E:T = 10:1). Auch die natürliche Zytotoxizität von RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen gegen K562 nahm in Abwesenheit von IL-2 geringfügig ab, wobei der Unterschied bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 statistisch signifikant war (Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 von $68,5 \% \pm 2,2 \%$ mit IL-2 auf $62,7 \% \pm 2,6 \%$ ohne IL-2). Im Fall der GD₂-exprimierenden SK-Mel-23-Zellen wurde bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 nach Kultivierung in IL-2-haltigem Medium eine CAR-induzierte Lyse von $34,7 \% \pm 4,6 \%$ gemessen, welche allerdings durch die Abwesenheit von IL-2 nicht beeinträchtigt wurde ($33,2 \% \pm 3,0 \%$). Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die autokrine Stimulation durch RD-IL15 neben dem Erhalt lebensfähiger CAR-NK-92-Zellen auch zur Aufrechterhaltung ihrer natürlichen und CAR-vermittelten zytotoxischen Aktivität führt.

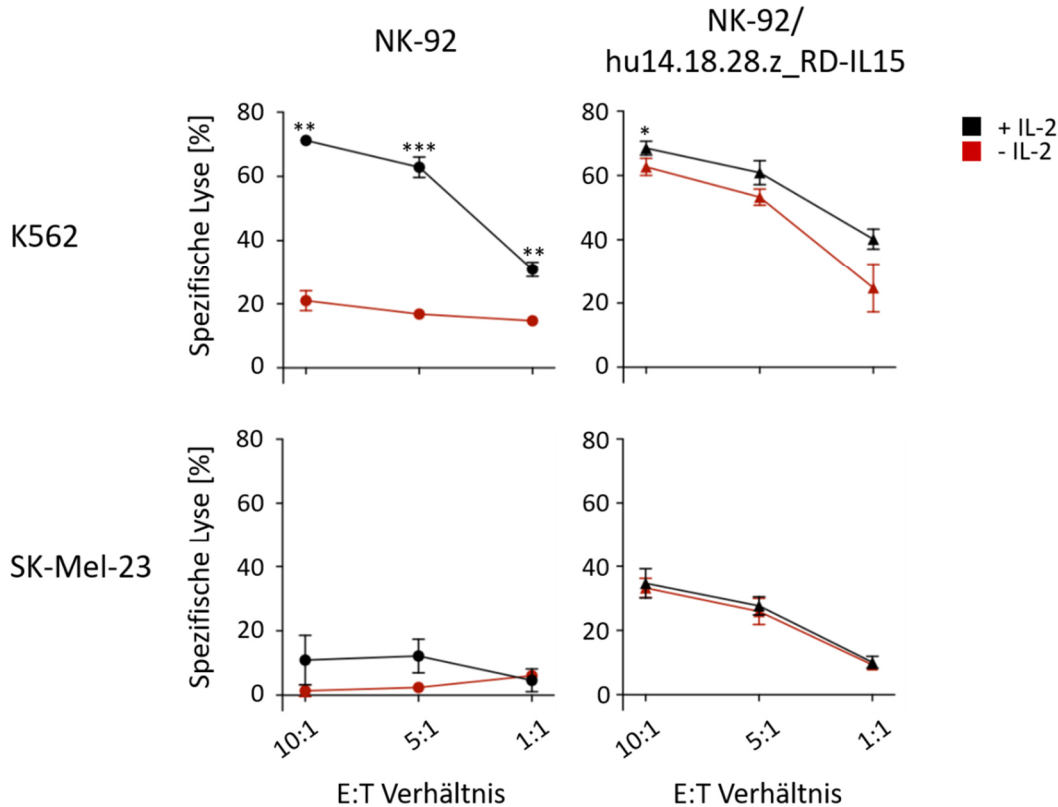


Abbildung 4.14: Zytotoxische Aktivität Zytokin-exprimierender CAR-NK-92-Zellen gegenüber etablierten Tumorzelllinien in der Abwesenheit von IL-2. Parentale NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurden für 3 Tage in Kultivierungsmedium mit (schwarze Linie) oder ohne IL-2 (rote Linie) ausgesät und anschließend mit GD₂-negativen K562- oder CAR-Antigen-exprimierenden SK-Mel-23-Zellen in den angegebenen Effektor- zu Zielzell- (E:T) Verhältnissen vermischt. Die Ko-Kultivierung erfolgte für 4 h bei 37 °C in dem für die vorherige Kultivierung verwendeten Medium. Anschließend wurde die spezifische Lyse durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Experimente. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

In früheren Studien wurde beschrieben, dass sich eine andauernde Stimulation mit IL-15 negativ auf die Effektorfunktion und Lebensfähigkeit von NK-Zellen auswirken kann [Elpek et al., 2010; Felices et al., 2018]. Daher wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die ektopische Expression von RD-IL15 nach längerer Zeit zu dysfunktionalen CAR-NK-92-Zellen führt. Hierfür wurden NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen und zum Vergleich parentale beziehungsweise GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15-Expression für mindestens vier Wochen in Wachstumsmedium kultiviert. Um den Effekt einer wiederholten Stimulation auf den Aktivierungszustand der NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Effektorzellen in parallelen Ansätzen für 3 Tage täglich entweder mit der Tumorzelllinie K562 oder der GD₂-positiven Lymphom-Zelllinie EL4 in einem E:T-Verhältnis von 1:2 stimuliert. NK-92-Zellen, welche ohne Tumorzellen kultiviert wurden, dienten als Kontrollen. Die kultivierten Zellen wurden anschließend im Hinblick auf die Oberflächenexpression der aktivierenden Marker NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D und der inhibitorischen Moleküle NKG2A, KIR2D, CD96, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIGIT und TIM-3, welche mit einem erschöpften, anergischen NK-Zell-Phänotyp

Ergebnisse

assoziiert sind, durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die normalisierte MFI (*Mean fluorescence intensity*) der jeweiligen Marker, welche sich aus dem Verhältnis der gefärbten zu den ungefärbten Proben berechnet (siehe Abb. 4.15). Im unstimulierten Zustand wurden zwischen den einzelnen Effektorzelllinien größtenteils keine signifikanten Unterschiede in der Markerexpression festgestellt. Allerdings wies der aktivierende Rezeptor NKG2D auf NK-92/hu14.18.28.z-Zellen verglichen zu parentalen NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen eine leicht erhöhte Expression auf. Ebenfalls wurde bei CAR-NK-92-Zellen eine gesteigerte NKp30-Expression nachgewiesen, die bei der RD-IL15-exprimierenden Variante noch etwas stärker ausgeprägt war. NK-92/hu14.18.28.z-Zellen zeigten des Weiteren ein leicht erhöhtes Expressionsniveau des inhibitorischen Moleküls TIGIT. RD-IL15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen wiesen dagegen im unstimulierten Zustand im Vergleich zu parentalen NK-92 keine gesteigerte Oberflächenexpression inhibitorischer Moleküle auf. Stattdessen wurde eine deutliche Herunterregulation des Markers NKG2A festgestellt.

Nach wiederholter Stimulation mit K562- und EL4-Zellen ergaben sich bei der Expression von NKp46 und den inhibierenden Markern TIGIT, LAG-3 und KIR2D in allen Effektorzellgruppen keine signifikanten Unterschiede zu unstimulierten Zellen. Während auch NKp44 und NKG2D auf NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen nach Ko-Kultivierung mit Zielzellen unverändert blieben, zeigte sich bei RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen eine signifikante Steigerung der Expression dieser Rezeptoren nach Stimulation mit K562. Im Fall von NKp30 wurde eine Abnahme der Expression nach andauernder Aktivierung auf parentalen NK-92- und CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 beobachtet, wohingegen das Expressionsniveau auf NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen konstant blieb. Des Weiteren wurde auf NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen eine erhöhte Expression der inhibitorischen Marker NKG2A und TIM-3 nach Stimulation mit EL4- und in stärkerem Ausmaß nach Ko-Inkubation mit K562-Zellen festgestellt. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen, welche die jeweiligen Rezeptoren jedoch sowohl im unstimulierten wie auch im stimulierten Zustand in geringerem Maß exprimierten als die Vergleichszellen. Eine wiederholte Stimulation mit K562 führte bei NK-92-, NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen gleichermaßen zur Herunterregulation von CD96. Dagegen wurde eine gesteigerte PD-1-Expression parentaler NK-92-Zellen beobachtet, die für CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 weniger ausgeprägt war und für NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Während die Expression von PD-L1 auf NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen konstant war, nahm sie auf NK-92/hu14.18.28.z-Zellen nach Ko-Inkubation mit EL4-Zellen ab.

Ergebnisse

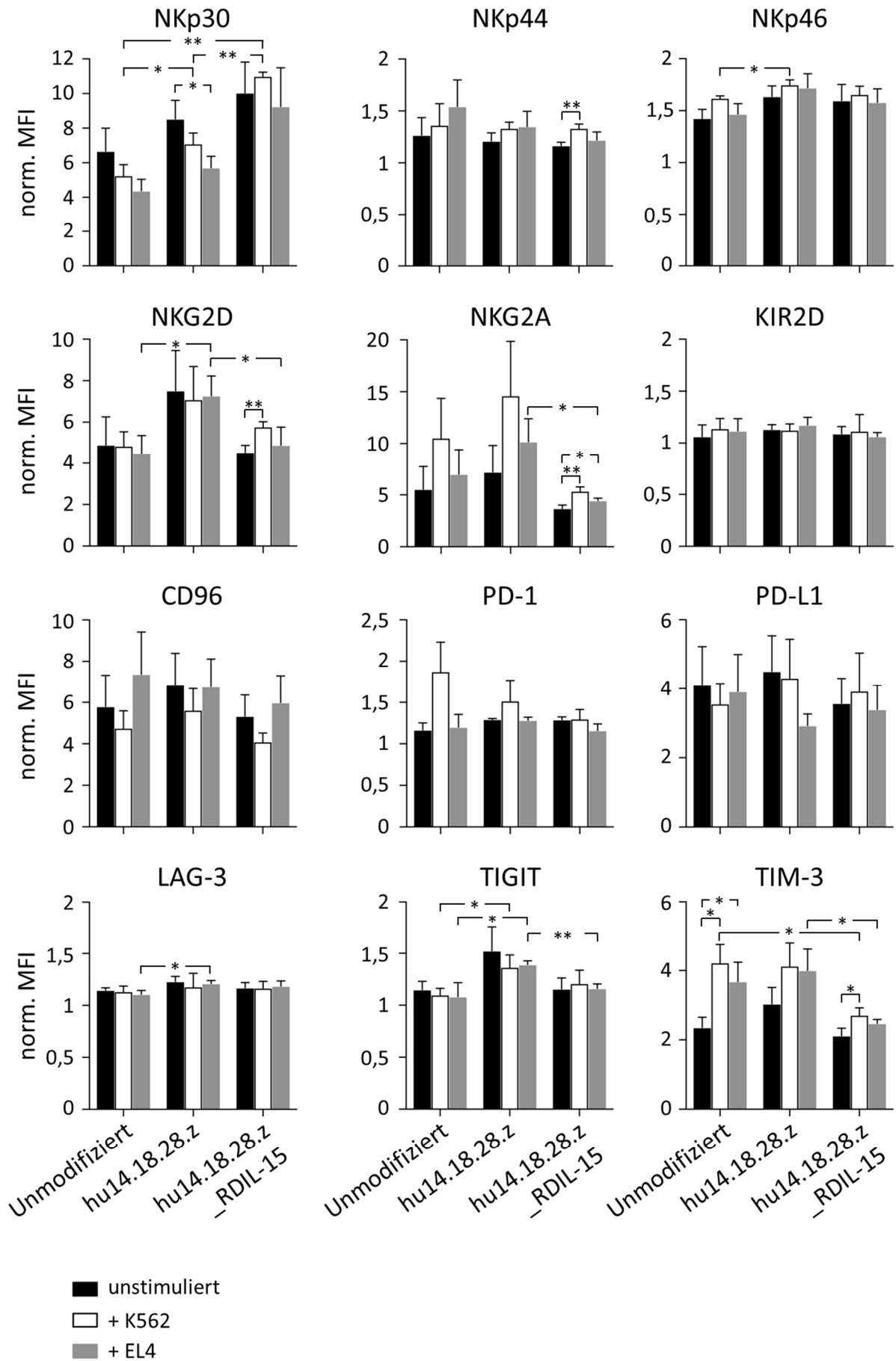


Abbildung 4.15: Markerexpression von parentalen NK-92- und CAR-NK-92-Zellen nach wiederholter Stimulation. Für eine wiederholte Stimulation wurden NK-92-, NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen mit GD₂-negativen K562- oder GD₂-positiven EL4-Zellen ko-inkubiert. Diese wurden in einem E:T-Verhältnis von 1:2 nach jeweils 24, 48 und 72 h zugegeben. Nach 3 Tagen wurde die Oberflächenexpression aktivierender und inhibitorischer Marker auf den jeweiligen Effektorzelllinien bestimmt. NK-92-Zellen, welche ohne Zielzellen kultiviert wurden, dienten hierbei als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. MFI: *Mean fluorescence intensity*. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die anhaltende Expression des IL-15-Superagonisten in CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zu parentalen NK-92- oder NK-92/hu14.18.28.z-Zellen keinen negativen Einfluss auf ihren Aktivierungszustand hat. Vielmehr scheint RD-IL15 zu einem gewissen Maß der Erschöpfung von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nach wiederholter Stimulation entgegenzuwirken. Darauf weisen die Aufrechterhaltung der Expression aktivierender Marker und die verringerte Expression inhibitorischer Rezeptoren hin.

4.2.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 bis 4.2.3

In den in Abschnitt 4.2.1 dargestellten Experimenten wurde RD-IL15 auf der Oberfläche von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen detektiert, was die erfolgreiche Expression und Sekretion des IL-15-Superagonisten zeigte. Zudem konnte mittels Immunoblot phosphoryliertes STAT5 in RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.2). Dies belegt die autokrine Stimulierung der NK-92-Zellen durch den sekretierten IL-15-Superagonisten. Dadurch erhielten NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen auch einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber parentalen NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen (Abschnitt 4.2.3). So blieb die Proliferation von CAR-NK-92-Zellen durch die Expression von RD-IL15 in Abwesenheit von IL-2 erhalten. Eine Resistenz der Zellen gegenüber der Bestrahlung mit 10 Gy ergab sich dadurch jedoch nicht, so dass diese Sicherheitsmaßnahme auch bei einem möglichen Einsatz von RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen für die adoptive Immuntherapie genutzt werden könnte. In Zytotoxizitätsassays wurde gezeigt, dass die Expression von RD-IL15 zudem einen Erhalt der natürlichen und CAR-vermittelten Zytotoxizität von CAR-NK-92-Zellen nach mehrtägiger Kultivierung in IL-2-freiem Medium bewirkte. Die langanhaltende autokrine Stimulierung durch den IL-15-Superagonisten, wie in einer durchflusszytometrischen Analyse aktivierender und inhibitorischer Marker bestätigt werden konnte, führte nicht zu dysfunktionalen CAR-NK-92-Zellen.

4.3 Parakriner Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen

In den vorangegangenen Analysen konnten die ektopische Expression des IL-15-Superagonisten und dessen autokrine Wirkung auf NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen gezeigt werden. Der Überlebensvorteil RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen wurde dabei unter anderem in deren Selbstanreicherung in IL-2-freiem Kultivierungsmedium deutlich (siehe Abb. 4.12). Der Anteil modifizierter NK-92-Zellen stagnierte jedoch auch nach mehrwöchiger Kultivierung bei etwa 85 %. Die verbleibenden 15 % unmodifizierter Zellen blieben trotz IL-2-Defizit vital, was in reiner Kultur unmodifizierter Zellen nicht beobachtet wurde (siehe Abb. 4.11). Daher war davon auszugehen, dass biologisch aktives RD-IL15 in den Überstand abgegeben wird und infolgedessen umgebende Immunzellen parakrin stimulieren kann. Mittels eines Sandwich-ELISA wurde zunächst die Menge des in den Überstand sekretierten RD-IL15 quantifiziert. Für die Analyse wurde konditioniertes Medium der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellkultur (siehe 3.3.13) in eine mit einem IL-15-spezifischen Antikörper beschichtete ELISA-Platte transferiert. Als Kontrolle dienten Zellkulturüberstände parentaler NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen. Mittels eines Biotin-gekoppelten, IL-15 α -spezifischen Antikörpers und der anschließenden Zugabe von Streptavidin-HRP wurde dann im Überstand befindliches RD-IL15 detektiert. Für dessen Quantifizierung wurde das aufgereinigte Antikörperperfusionsprotein His₆-RD-IL15 (Kiefer et al., unveröffentlicht) als Standardprotein mitgeführt (siehe Abb. 4.16).

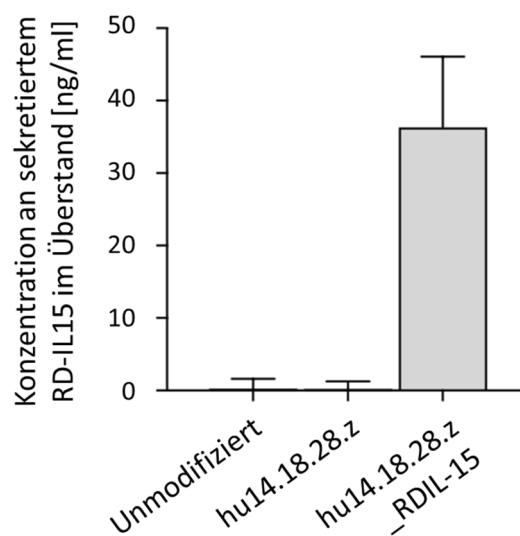


Abbildung 4.16: Quantifizierung des sekretierten IL-15-Superagonisten. Konditioniertes Medium der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellkultur wurde 1:1 mit 7,5 % BSA (in DPBS) verdünnt und anschließend in einem Volumen von 100 μ l in eine ELISA-Platte überführt. Sekretierter IL-15-Superagonist wurde in einem Sandwich-

Ergebnisse

ELISA mit Hilfe eines IL-15-spezifischen Antikörpers gebunden und anschließend mittels eines Biotin-gekoppelten, IL-15R α -spezifischen Antikörpers sowie Streptavidin-HRP nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgte nach Zugabe der TMB-Substratlösung unter Verwendung von His₆-RD-IL15 als Standardprotein. Als Kontrollen wurden Zellkulturüberstände parentaler NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen mitgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente.

Nach 3-tägiger Kultivierung in IL-2-freiem Medium wurde so im Überstand von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen sekretierter IL-15-Superagonist in einer Konzentration von $36,4 \pm 9,7$ ng/ml gemessen. In den Überständen von parentalen NK-92-Zellen und CAR-NK-92-Zellen ohne ektopische RD-IL15-Expression wurde erwartungsgemäß kein IL-15-Superagonist nachgewiesen ($0,1 \pm 1,5$ ng/ml beziehungsweise $0,1 \pm 1,2$ ng/ml).

Um zu überprüfen, ob sekretiertes RD-IL15 biologisch aktiv ist und Immunzellen parakrin stimulieren kann, wurde ein Proliferationsassay mit der IL-2-/IL-15-abhängigen murinen T-Zelllinie CTLL-2 und konditioniertem Medium der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellkultur (siehe 3.3.13) durchgeführt [Gillis et al., 1978; Grabstein et al., 1994]. CTLL-2-Zellen wurden hierfür in konditioniertem Medium aufgenommen und in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro ml in einem Gesamtvolumen von 200 μ l ausgesät. Um zum Vergleich den Effekt einer definierten Konzentration von Zytokinen auf die Proliferation von CTLL-2-Zellen zu ermitteln, wurden diese in parallelen Ansätzen in Kultivierungsmedium (RPMI⁺⁺⁺ + β -Mercaptoethanol) resuspendiert und mit 50 IU/ml humanem IL-2 beziehungsweise verschiedenen Konzentrationen von humanem IL-15 versetzt (siehe Abb. 4.17). Unstimulierte Proben dienten als Negativkontrolle. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden an Tag 3 und 7 die Gesamtzellzahlen der einzelnen Ansätze (Gesamtvolumen 200 μ l) bestimmt. Die Analysen ergaben, dass IL-2- und IL-15-haltiges Medium erwartungsgemäß eine konstante Proliferation von CTLL-2-Zellen induzierten, welche bei einer IL-2-Gabe von 50 IU/ml an Tag 7 zu einer Gesamtzellzahl von $2,46 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen führte. Die hier verwendete Maximalkonzentration von 5 ng/ml exogenem IL-15 führte innerhalb von 7 Tagen zu einer leicht niedrigeren Wachstumsrate, die sich in einer geringeren Zellzahl von $1,98 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen ausdrückte. Nach 1-wöchiger Stimulation mit konditioniertem Medium wurde im Vergleich zur zytokinfreien Kultivierung ebenfalls eine signifikant höhere Zellzahl von $4 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ Zellen ermittelt, die allerdings deutlich niedriger war als die mit rekombinanten Zytokinen erreichte Zellzahl. Die Gesamtzahl lebender Zellen reduzierte sich dagegen ohne Stimulation nach 7 Tagen auf $0,9 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$.

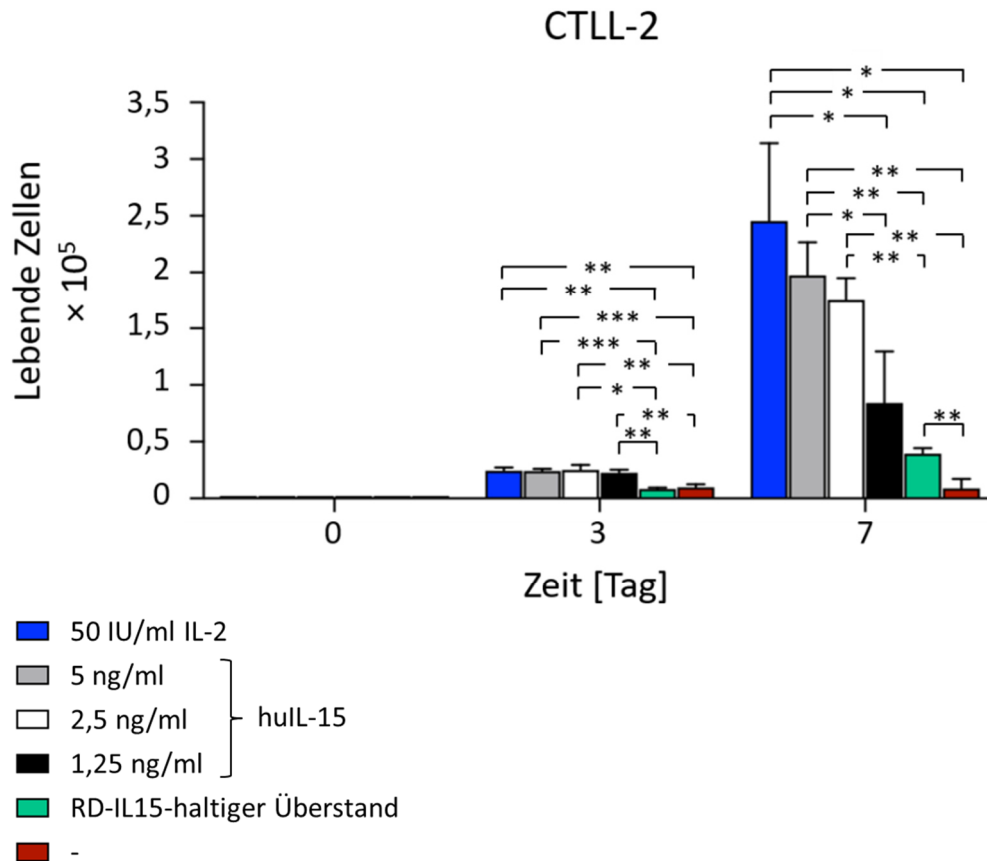


Abbildung 4.17: Einfluss der Sekretion von RD-IL15 auf die Proliferation von CTLL-2-Zellen. 2×10^3 CTLL-2-Zellen (Tag 0) wurden in 200 μ l konditioniertem Medium der RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen für 7 Tage kultiviert. Zur Kontrolle wurden Zellen entweder in Zytokin-freiem Medium (RPMI⁺⁺⁺ + β -Mercaptoethanol) kultiviert oder zusätzlich mit 50 IU/ml exogenem IL-2 beziehungsweise 1,25, 2,5 oder 5 ng/ml humanem IL-15 stimuliert. An Tag 3 und 7 wurde die Zellzahl bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der IL-15-Superagonist biologisch aktiv ist und in ausreichenden Mengen sekretiert wird, um eine parakrine Stimulation umgebender Zellen zu ermöglichen. Im Vergleich zu den mit rekombinantem IL-2 und IL-15 stimulierten Ansätzen zeigte sich jedoch ein geringerer Effekt nach Kultivierung im konditionierten Medium der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellkultur.

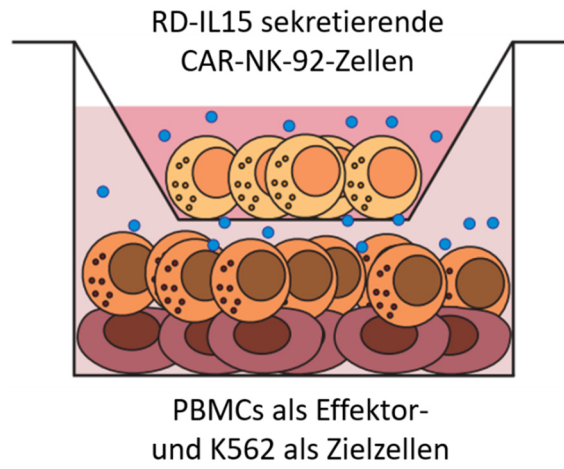
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob RD-IL15-sekretierende CAR-NK-92-Zellen in der Lage sind, umliegende primäre Immunzellen zu stimulieren. Hierfür wurden für die nachfolgenden Experimente Transwell-Einsätze zur räumlichen Trennung von NK-92- und primären Immunzellen verwendet. Diese ermöglichen die Diffusion von löslichen Faktoren, jedoch nicht von Zellen, so dass die direkte Wirkung von RD-IL15 ohne eine mögliche Beeinflussung durch Zell-Zell-Kontakte untersucht werden kann.

Ergebnisse

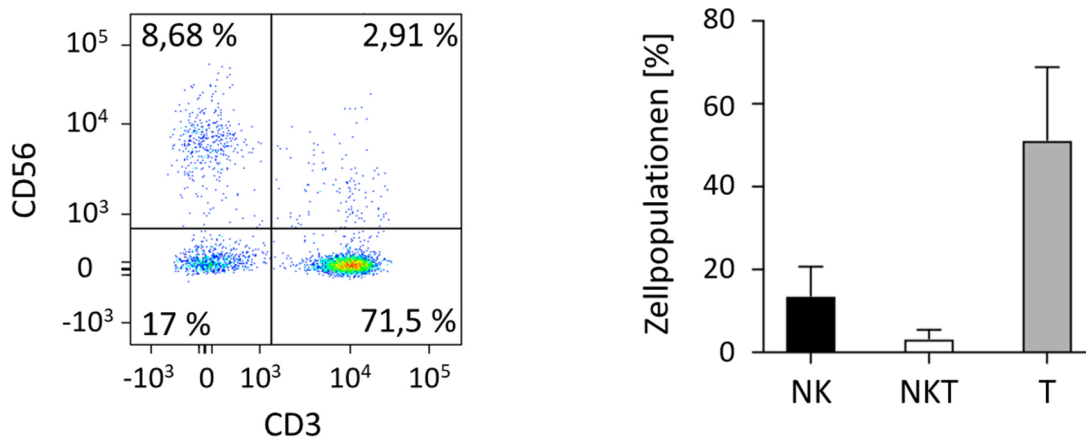
Zunächst wurde in einem Transwell-Zytotoxizitätsassay überprüft, ob die Sekretion von RD-IL15 einen stimulierenden Effekt auf die Antitumoraktivität primärer Immunzellen hat. Hierfür wurden PBMCs gesunder Spender in einer Dichte von $2,4 \times 10^6$ Zellen/ml pro Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät. Transwells mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen wurden anschließend in die Well-Platte eingesetzt und für 16 h mit den vorgelegten PBMCs ko-kultiviert (siehe Abb. 4.18, A). Spender-Lymphozyten, welche allein oder mit CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 (NK-92/hu14.18.28.z) inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Um den Effekt einer definierten Konzentration von IL-15 ermitteln zu können, wurden PBMCs in einem weiteren Ansatz über Nacht mit 20 ng/ml humanem IL-15 stimuliert. Am nächsten Tag wurden CV (Calcein Violet)-gefärbte K562-Zellen in einem E:T-Verhältnis von 20:1 zu den PBMCs der jeweiligen Ko-Kulturen gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Zellsuspensionen mit PI versetzt und der Anteil lysierter Tumorzellen anhand der CV- und PI-gefärbten Population durchflusszytometrisch bestimmt. Durch die Verwendung der MHC I-negativen Tumorzelllinie K562 wird mit diesem Assay insbesondere die antitumorale Aktivität von NK-Zellen in den PBMCs erfasst. Der Anteil der NK-Zellen (CD3⁺CD56⁺) wurde nach PBMC-Isolierung anhand der Marker CD3 und CD56 bestimmt und belief sich auf $13,7 \% \pm 7,0 \%$ der Gesamtpopulation von PBMCs (siehe Abb. 4.18, B). Die durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsanalysen ergaben, dass PBMCs, welche allein kultiviert wurden, $11,5 \% \pm 5,2 \%$ der K562-Zellen lysierten (siehe Abb. 4.18, C). Während die Stimulierung mit huIL-15 zu einer signifikanten Steigerung der Tumorzelllyse auf $40,1 \% \pm 8,0 \%$ führte, bewirkte die Ko-Kultur mit CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 keine Erhöhung der Antitumoraktivität der PBMCs ($15,8 \% \pm 8,7 \%$). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle steigerte die Inkubation mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen die Zytotoxizität von PBMCs dagegen um das etwa 2- bis 3-fache auf $34,0 \% \pm 5,1 \%$.

Ergebnisse

A



B



C

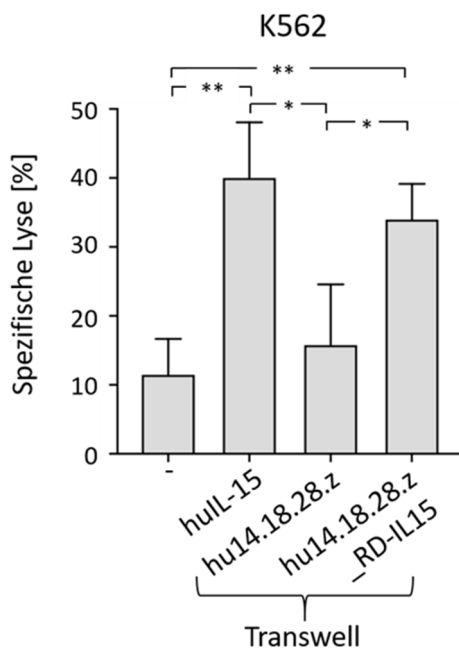


Abbildung 4.18: Auswirkung von sekretiertem RD-IL15 auf die Zytotoxizität benachbarter Immunzellen. (A) Schematische Darstellung eines Transwell-Zytotoxizitätsassays. PBMCs eines gesunden Spenders wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät (pro Vertiefung $2,4 \times 10^6$ Zellen in 1 ml IL-2-freiem X-Vivo⁺). Für die Ko-Kultivierungsansätze wurden Transwells mit jeweils 3×10^5 CAR-NK-92-Zellen in 300 μ l konditioniertem Medium in die mit PBMCs versehenen Vertiefungen eingesetzt. Nach 16-stündiger Stimulation wurden CV-gefärbte K562-Zellen zu den PBMCs in einem E:T-Verhältnis von 20:1 gegeben und für 2 h ko-inkubiert. Während dieses Zeitraums verblieben die Transwell-Einsätze in der 24-Well-Platte. **(B) Anteile der NK-, NKT- und T-Zellpopulationen nach PBMC-Isolierung.** PBMCs eines gesunden Spenders wurden nach Isolierung mit einem APC/Fire 750-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD3 und einem BV421-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD56 durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde zwischen NK- ($CD3^+CD56^+$), NKT- ($CD3^+CD56^+$) und T-Zellen ($CD3^+CD56^-$) unterschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente mit PBMCs unterschiedlicher Spender. **(C) Stimulation der zytotoxischen Aktivität primärer Immunzellen gegenüber K562-Zellen nach Ko-Kultivierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen.** Nach 2-stündiger Ko-Inkubation wurden die Zellsuspensionen aus PBMCs und K562-Zellen aus den jeweiligen Vertiefungen geerntet und mit PI gefärbt. Der prozentuale Anteil lysierter Tumorzellen wurde anhand der PI/CV-positiven Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten PBMCs, welche in Abwesenheit von CAR-NK-92-Zellen beziehungsweise in Anwesenheit von NK-92/hu14.18.28.z-Zellen kultiviert wurden. Vergleichend wurden PBMCs über Nacht mit 20 ng/ml humanem IL-15 stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente mit PBMCs unterschiedlicher Spender. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Damit lässt sich der PBMC-stimulierende Effekt auf sekretiertes RD-IL15 zurückführen. Dies weist nach, dass der IL-15-Superagonist von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen in ausreichendem Maße in den Überstand abgegeben wird, um die Antitumortumoraktivität primärer Immunzellen gegenüber K562-Zellen zu steigern.

Im nächsten Schritt wurde die durch RD-IL15 vermittelte Stimulation von primären Immunzellen in einem Transwell-basierten Proliferationsassay weiter untersucht. Hierfür wurden NK-Zellen eines gesunden Spenders mittels des *RosetteSep™ Human NK Cell Enrichment Cocktails* (STEMCELL™) nach Herstellerangaben isoliert, mit CFSE gefärbt und in zytokinfreiem Kultivierungsmedium bei einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Für die Ko-Kultivierungsansätze wurden die primären NK-Zellen in Transwell-Einsätze pipettiert und anschließend in Vertiefungen einer 24-Well-Platte eingebracht, in denen bereits RD-IL15-sekretierende CAR-NK-92-Zellen oder NK-92/hu14.18.28.z-Zellen als Negativkontrolle vorgelegt waren (siehe Abb. 4.19, A). In weiteren Kontrollansätzen wurden primäre NK-Zellen in gleicher Dichte in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben und entweder allein kultiviert oder mit einer definierten Konzentration an humanem IL-15 (20 ng/ml) versetzt. Es folgte eine 7-tägige Inkubation bei 37 °C, wobei die primären NK-Zellen nach 4 Tagen erneut stimuliert wurden. Hierfür wurden sie nach Zentrifugation in frischem Kultivierungsmedium aufgenommen und ein weiteres Mal unter den oben beschriebenen Bedingungen stimuliert. Für die Ko-Kulturen wurden die mit primären NK-Zellen versehenen Transwells in eine neue 24-Well-Platte mit entsprechenden CAR-NK-92-Zellen eingebracht. Für die Endpunkt-Analyse an Tag 8 wurden die primären NK-Zellen aus den jeweiligen Vertiefungen entnommen und anhand der Marker CD3 und CD56 durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde zwischen $CD3^+CD56^{\text{bright}}$ und $CD3^+CD56^{\text{dim}}$

unterschieden, wobei CD56^{bright}-Zellen eine geringere Zytotoxizität und höhere Produktion immunregulatorischer Zytokine aufweisen. Die CD56^{dim}-Untergruppe gilt hingegen als zytotoxisch aktiver und produziert nur zu einem geringen Maß Zytokine [Cooper et al., 2001]. Proliferierende NK-Zellen wurden anhand des abnehmenden CFSE-Signals (CFSE^{low}) von ruhenden NK-Zellen unterschieden.

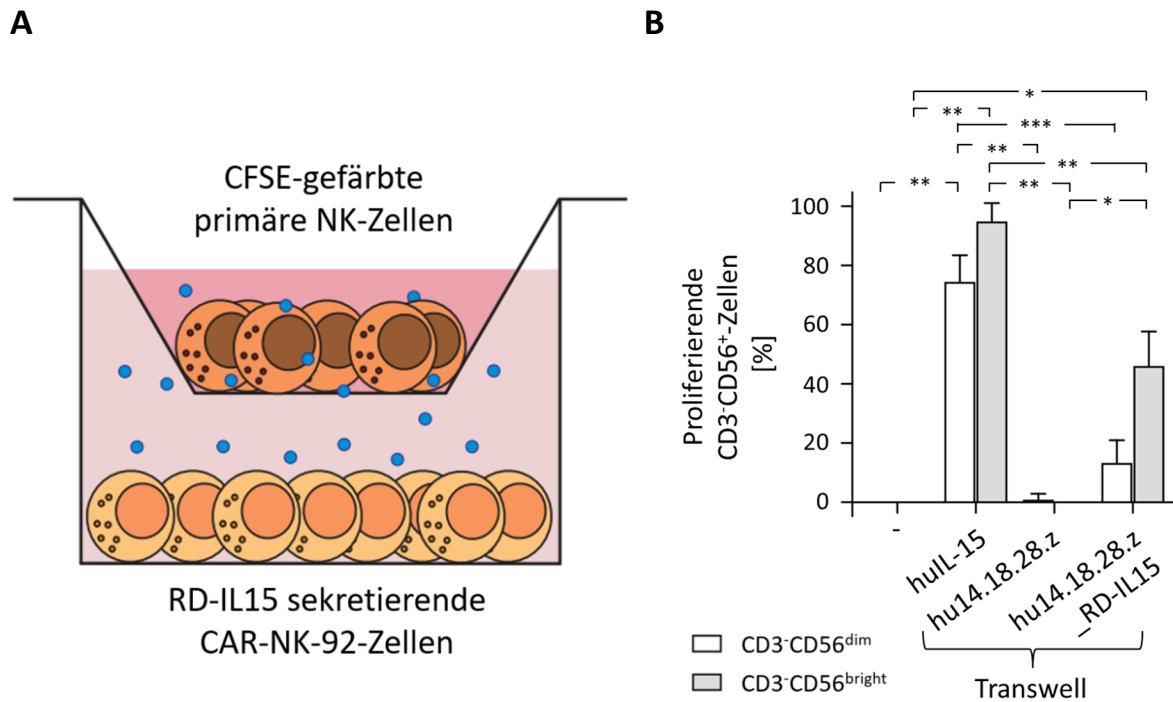


Abbildung 4.19: Stimulatorische Wirkung von sekretiertem RD-IL15 auf die Proliferation primärer NK-Zellen. (A) Schematische Darstellung eines Transwell-Proliferationsassays. Primäre NK-Zellen eines gesunden Spenders wurden nach Isolierung mit CFSE gefärbt und für die Ko-Kultivierungsansätze in Transwell-Einsätze pipettiert (pro Transwell $1,5 \times 10^5$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ IL-2-freiem X-Vivo⁺). Anschließend wurden diese in eine 24-Well-Platte, in denen pro Vertiefung jeweils 1×10^6 CAR-NK-92-Zellen in 1 ml konditioniertem Medium vorgelegt wurden, überführt. Es folgte eine 7-tägige Stimulierung, wobei an Tag 4 eine erneute Stimulierung durchgeführt wurde. Hierfür wurden mit primären NK-Zellen versehene Transwells in eine neue 24-Well-Platte mit CAR-NK-92-Zellen eingesetzt. **(B) Stimulation der Proliferation primärer NK-Zellen nach Ko-Kultivierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen.** Nach 7 Tagen wurden die primären NK-Zellen aus den jeweiligen Vertiefungen entnommen und mit CD3- und CD56-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die NK-Zellpopulation wurde hierbei in CD3⁺CD56^{bright} (graue Balken) und CD3⁺CD56^{dim}-Subpopulationen (weiße Balken) unterteilt. Der prozentuale Anteil proliferierender NK-Zellen wurde dabei anhand eines reduzierten CFSE-Signals durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten NK-Zellen, welche in Abwesenheit von CAR-NK-92-Zellen beziehungsweise in Anwesenheit von NK-92/hu14.18.28.z-Zellen kultiviert wurden. Zum Vergleich wurden NK-Zellen in einem weiteren Ansatz mit 20 ng/ml humanem IL-15 stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente mit NK-Zellen unterschiedlicher Spender. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

NK-Zellen, welche ohne jegliche Stimulation kultiviert wurden, zeigten erwartungsgemäß keine Proliferation, während eine 1-wöchige Ko-Kultivierung mit CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 zu einer minimalen Proliferation von CD56^{dim}-Zellen führte ($1,0\% \pm 1,8\%$) (siehe Abb. 4.19, B). Die

Ergebnisse

Stimulation mit humanem IL-15 hingegen induzierte eine signifikante Zunahme von CFSE^{low}-NK-Zellen. Hierbei betrug der Anteil proliferierender Zellen im Fall der CD56^{dim}-Subpopulation 74,6 % ± 8,9 %, während CD56^{bright}-Zellen zu 95,0 % ± 6,1 % proliferierten. Dieselbe Tendenz zeigte sich nach Ko-Inkubation mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen. Diese führte im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne CAR-NK-92-Zellen beziehungsweise mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen zu einem deutlichen Anstieg proliferierender NK-Zellen. Der prozentuale Anteil proliferierender CD56^{dim}-Zellen belief sich auf 13,4 % ± 7,5 %, wohingegen der Effekt auf die CD56^{bright}-Population mit einem Anteil von 46,2 % ± 11,5 % CFSE^{low}-NK-Zellen noch stärker ausgeprägt war. Sowohl die Stimulation mit humanem IL-15 wie auch RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen hatte somit einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum der CD56^{bright}-Subpopulation. Auch wenn der Effekt der Ko-Kultur mit NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen weniger stark ausgeprägt war als der von rekombinantem IL-15, lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen des Ko-Kultivierungsexperiments schlussfolgern, dass die Konzentration von sekretiertem IL-15-Superagonisten ausreicht, um Überleben und Proliferation primärer NK-Zellen zu fördern.

In einem weiteren Experiment wurde in einer Transwell-basierten, gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) der stimulatorische Effekt von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen auf CD8-positive T-Zellen untersucht. Hierfür wurden PBMCs zweier gesunder Spender isoliert. CFSE-gefärbte PBMCs des einen Spenders dienten als Effektorzellen und wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit bestrahlten, CD3-negativen PBMCs des anderen Spenders gemischt. Letztere fungierten als Stimulatorzellen, deren fremder MHC-Komplex von den T-Zellen des ersten Spenders erkannt wird und dadurch eine Alloreaktion auslöst. Diese zeigt sich in der Aktivierung und anschließenden Proliferation der Effektorzellpopulation. Ein möglicher additiver Effekt durch sekretiertes RD-IL15 kann dabei anhand der Proliferationsrate CD8-positiver T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Effektor- und Stimulatorzellen wurden für die Ko-Kultivierungsansätze in Transwell-Einsätzen ausgesät. Diese wurden anschließend in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen beziehungsweise NK-92/hu14.18.28.z-Zellen als Negativkontrolle eingebracht (siehe Abb. 4.20, A). Vergleichbar mit dem zuvor gezeigten Proliferationsexperiment (siehe Abb. 4.19) wurden als Kontrolle PBMCs direkt in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 20 ng/ml humanem IL-15 versetzt oder ohne Stimulation kultiviert. Um den alleinigen Effekt der Stimulatorzellen ermitteln zu können, wurden Effektorzellen in parallelen Ansätzen in deren Abwesenheit kultiviert. Es folgte eine Inkubation für 7 Tage bei 37 °C, wobei wie im vorherigen Experiment eine erneute Stimulation an Tag 4 durchgeführt wurde. An Tag 8 wurden die PBMCs aus den Vertiefungen entnommen und mit Antikörpern spezifisch für CD3 und CD8

Ergebnisse

durchflusszytometrisch analysiert. Proliferierende wurden von ruhenden CD8-positiven T-Zellen mittels des reduzierten CFSE-Signals (CFSE^{low}) unterschieden.

Während die Kultivierung ohne jegliche Stimulation nur zu einer geringen Wachstumsrate CD8-positiver T-Zellen führte (2,2 % ± 3,8 %), steigerte die Ko-Inkubation mit Stimulatorzellen die CFSE^{low}-Effektorzellpopulation bereits deutlich (21,8 % ± 29,5 %) (siehe Abb. 4.20, B). Eine zusätzliche Erhöhung der Proliferation wurde durch die Gabe von huIL-15 ausgelöst. Diese äußerte sich nach 7-tägiger Kultivierung ohne Stimulatorzellen in 38,8 % ± 43,0 % und nach Ko-Kultivierung mit Stimulatorzellen in 57,9 % ± 37,1 % CFSE^{low}-, CD8-positiver T-Zellen. Im Vergleich hierzu zeigten die Ko-Kultivierungsansätze mit NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RDIL-15-Zellen eine allgemein niedrigere Proliferationsrate. Nichtsdestotrotz führte die Stimulation mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und der Ko-Inkubation mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen (4,0 % ± 2,3 %) zu einer signifikanten Steigerung des CFSE^{low}-Anteils CD8-positiver T-Zellen auf 15,1 % ± 4,2 %. Der Effekt des IL-15-Superagonisten wurde dabei durch die Zugabe von Stimulatorzellen weiter verstärkt und erhöhte die CFSE^{low}-Effektorzellpopulation auf 21,4 % ± 7,5 %. Dies verdeutlicht, dass RD-IL15 in ausreichender Menge sekretiert wurde, um sowohl als alleiniger Stimulus die Proliferation CD8-positiver T-Zellen zu gewährleisten als auch einen additiven Effekt auf deren Wachstumsrate in einer Alloreaktion zu bewirken.

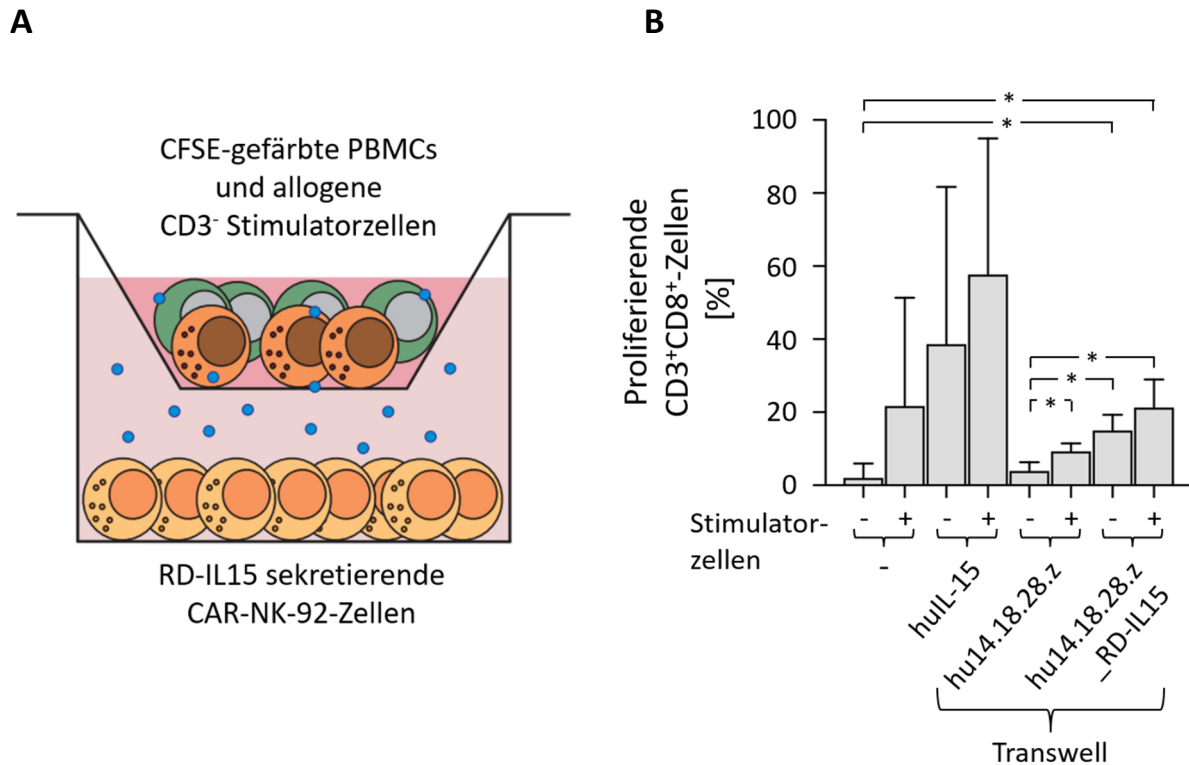


Abbildung 4.20: Einfluss der Sekretion von RD-IL15 auf die Proliferation von CD8-positiven T-Zellen. (A) Prinzip einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR). PBMCs zweier gesunder Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. CFSE-gefärbte PBMCs des ersten Spenders (Effektorzellen) wurden mit bestrahlten (25 Gy), CD3-negativen PBMCs des zweiten Spenders (Stimulatorzellen) in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und für die Ko-Kultivierungsansätze in Transwelleinsätze überführt (pro Transwell je $1,5 \times 10^5$ Effektor- und Stimulatorzellen in $200 \mu\text{l}$ IL-2-freiem X-Vivo⁺). Diese wurden daraufhin in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte eingebracht, in denen jeweils 1×10^6 CAR-NK-92-Zellen in 1 ml konditioniertem Medium vorgelegt wurden, und für 7 Tage kultiviert. An Tag 4 erfolgte eine erneute Stimulation. Hierfür wurden die mit PBMCs versehenen Transwells in eine neue 24-Well-Platte mit CAR-NK-92-Zellen überführt. **(B) Proliferation von CD8-positiven T-Zellen nach Ko-Kultivierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen.** Nach 7-tägiger Inkubation wurden die PBMCs aus den einzelnen Vertiefungen entnommen und anschließend mit Antikörpern spezifisch für CD3 und CD8 gefärbt. Proliferierende CD8-positive T-Zellen wurden anhand ihres abnehmenden CFSE-Signals (CFSE^{low}) durchflusszytometrisch quantifiziert. Als Kontrollen dienten unstimulierte und mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen ko-inkubierte PBMCs. In einem parallelen Ansatz wurden PBMCs mit 20 ng/ml humanem IL-15 stimuliert. Um die additive Wirkung der Alloreaktion auf die Proliferation CD8-positiver T-Zellen zu untersuchen, wurde zum Vergleich die Effektorzellpopulation in den jeweiligen Ansätzen ohne Stimulatorzellen kultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente mit PBMCs unterschiedlicher Spender. *: $p < 0,05$.

Innerhalb der CD8-positiven T-Zellpopulation ist IL-15 für das Langzeit-Überleben und die homöostatische Proliferation von T-Gedächtniszellen notwendig [Goldrath et al., 2002]. Diese können zum einen direkt aus aktivierten naiven T-Zellen (T_N), zum anderen aus einer Untergruppe aktivierter Effektorzellen (T_{EFF}) hervorgehen (siehe Abb. 4.21, A) [Omilusik und Goldrath, 2017]. Hierbei wird besonders zwischen zentralen (*Central memory*, T_{CM}) und Effektor-T-Gedächtniszellen (*Effector memory*, T_{EM}) unterschieden. Erstere differenzieren nach erneuter Antigen-vermittelter Stimulation zu T_{EM} -Zellen, welche schneller in der Lage sind, zu peripherem Gewebe zu migrieren und als Effektorzellen zu agieren [Sallusto et al., 2004].

Ergebnisse

Um den möglichen lebenserhaltenden Effekt des IL-15-Superagonisten auf T-Gedächtniszellen innerhalb der CD8-positiven T-Zellpopulation zu untersuchen, wurde wie zuvor eine Transwell-basierte, gemischte Lymphozytenreaktion (GLR) durchgeführt und nach 7 Tagen der Anteil an T_{CM} - und T_{EM} -Zellen anhand der Marker CD8, CCR7 und CD45RO durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 4.21). Der Chemokinrezeptor CCR7 ermöglicht die Migration der T-Zellen zu und innerhalb der sekundären lymphatischen Organe und wird sowohl von naiven T-Zellen wie auch T_{CM} -Zellen exprimiert. Unter zusätzlicher Verwendung des T-Gedächtniszellmarkers CD45RO, welcher sich auf T_{CM} - und T_{EM} -Zellen findet, kann somit zwischen den einzelnen CD8-positiven Subpopulationen unterschieden werden (siehe Abb. 4.21, B) [Sallusto et al., 2004].

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die Zugabe von Stimulatorzellen bereits zu einem erhöhten prozentualen Anteil an T_{CM} - ($4,9 \% \pm 4,1 \%$) und T_{EM} -Zellen ($49,8 \% \pm 22,3 \%$) im Vergleich zu PBMCs ohne jegliche Stimulation ($1,0 \% \pm 0,9 \%$ beziehungsweise $30,2 \% \pm 11,6 \%$) führte (siehe Abb. 4.21, C). Diese Tendenz wurde auch nach Stimulation mit huIL-15 beobachtet und äußerte sich nach 7-tägiger Kultivierung in $3,4 \% \pm 2,9 \% T_{CM}$ -Zellen und einer signifikanten Steigerung von T_{EM} -Zellen auf $54,2 \% \pm 10,3 \%$. Verstärkt wurde dieser durch huIL-15 induzierte Effekt durch eine zusätzliche Inkubation mit Stimulatorzellen ($6,4 \% \pm 5,6 \% T_{CM}$ - und $61,3 \% \pm 15,7 \% T_{EM}$ -Zellen). Im Vergleich zu unstimulierten und mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen ko-kultivierten PBMCs führte die Stimulation mit huIL-15 sowohl in Anwesenheit ($8,7 \% \pm 7,9 \%$) wie auch in Abwesenheit von Stimulatorzellen ($9,2 \% \pm 5,3 \%$) zu einem signifikant geringeren Anteil an naiven T-Zellen. Jedoch wurde keine Wirkung von huIL-15 auf die Population von T-Effektorzellen beobachtet. Die Ko-Kultivierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen hingegen zeigte einen weniger stark ausgeprägten Effekt auf die T-Gedächtniszellpopulation verglichen zu exogen zugegebenem huIL-15: Während ebenfalls eine deutliche Abnahme der T_N -Population in Gegenwart ($19,5 \% \pm 12,9 \%$) beziehungsweise in Abwesenheit von Stimulatorzellen ($17,2 \% \pm 8,6 \%$) zu beobachten war, zeigte sich kein stimulierender Effekt auf die T_{CM} -Subpopulation. Es wurde lediglich eine leichte Steigerung des Anteils an T_{EM} -Zellen ohne ($38,4 \% \pm 9,9 \%$) beziehungsweise mit Stimulatorzellen ($38,2 \% \pm 11,9 \%$) festgestellt. Hierbei war der Unterschied zu unstimulierten und mit NK-92/hu14.18.28.z ko-inkubierten Ansätzen jedoch nicht statistisch signifikant.

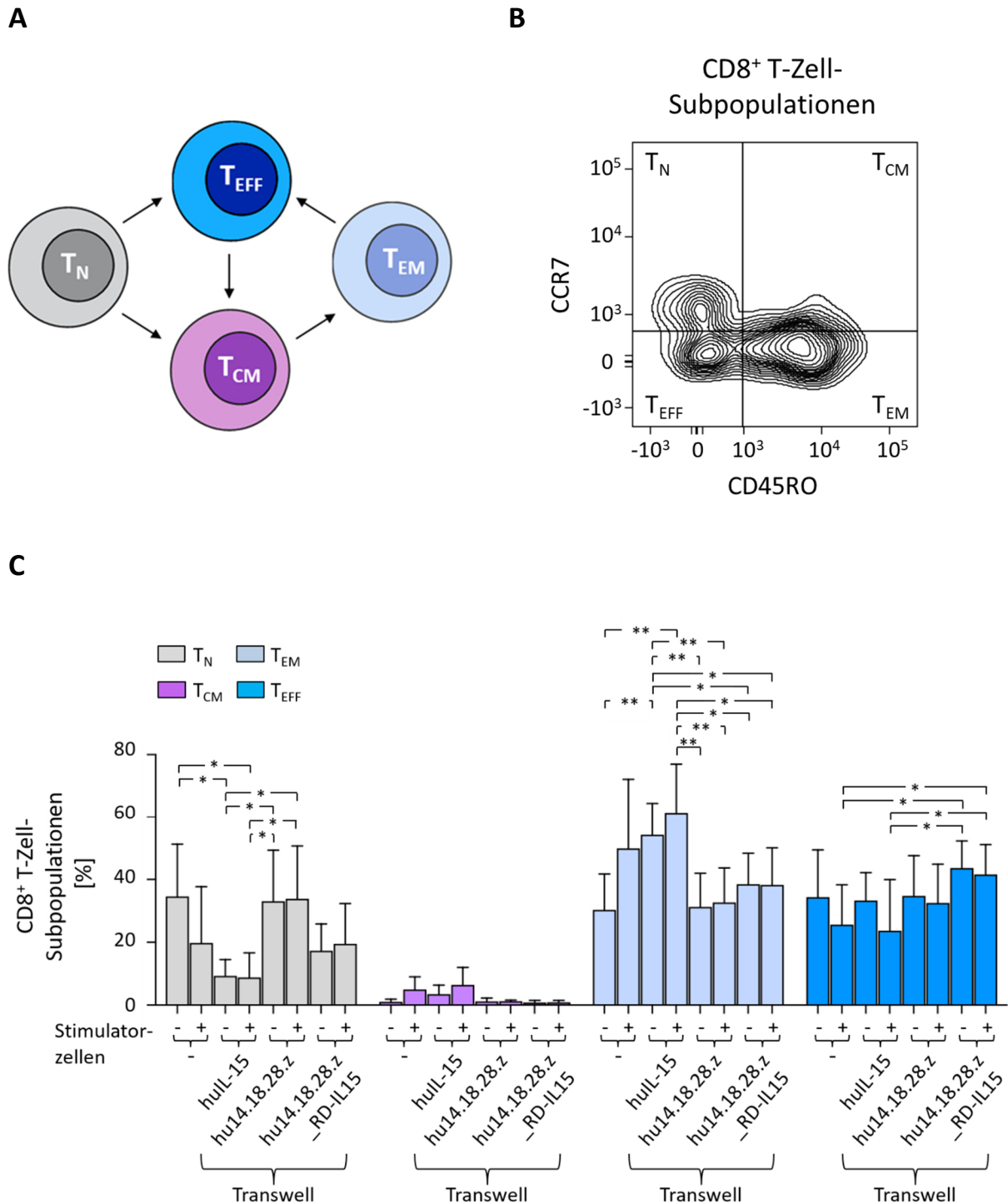


Abbildung 4.21: Einfluss der Sekretion von RD-IL15 auf CD8-positive T-Gedächtniszellen. (A) Schematische Darstellung der Differenzierung zu T-Gedächtniszellen. T-Gedächtniszellen können sich direkt aus aktivierten naiven T-Zellen oder aus einem Teil aktivierter Effektorzellen entwickeln. Wiederholte Antigen-induzierte Stimulation führt zu einer Differenzierung von in lymphoidem Gewebe befindlichen T_{CM}- zu T_{EM}-Zellen. Diese migrieren vorrangig in peripheres nicht-lymphoides Gewebe und können nach Antigenstimulierung schnell rekrutiert werden und zu T-Effektorzellen (T_{EFF}) reifen. **(B) Gating-Strategie zur Unterscheidung von CD8-positiven T-Zell-Subpopulationen.** CD8-positive Zellen wurden mittels eines spezifischen Antikörpers durchflusszytometrisch identifiziert. Anschließend wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen T_N, T_{CM}, T_{EM} und T_{EFF} mit Antikörpern spezifisch für CCR7 und CD45RO bestimmt. **(C) Stimulation von CD8-positiven T-Gedächtniszellen nach Ko-Kultivierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen.** PBMCs zweier gesunder Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und wie in

Abb. 4.20 beschrieben für die Transwell-basierte GLR unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen für 7 Tage kultiviert. Nach 1-wöchiger Inkubation wurden die jeweiligen Ansätze aus den Vertiefungen entnommen und mit Antikörpern spezifisch für CD8, CCR7 und CD45RO gefärbt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der CD8-positiven Subpopulationen T_N (graue Balken), T_{CM} (lila Balken), T_{EM} (graublau Balken) und T_{EFF} (blaue Balken) durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen wurden PBMCs mitgeführt, welche allein ohne exogene Stimulation kultiviert, mit 20 ng/ml humanem IL-15 versehen oder mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen kokultiviert wurden. Um den Effekt der Alloreaktion auf die Entwicklung von T-Gedächtniszellen zu bestimmen, wurden die jeweiligen Ansätze jeweils ohne oder mit Stimulatorzellen kultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten mit PBMCs unterschiedlicher Spender. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.3.1 Zusammenfassung des Abschnitts 4.3

In den in Abschnitt 4.3 dargestellten Experimenten wurde ein möglicher stimulierender Effekt von RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen untersucht. In einem ELISA konnte die Sekretion des IL-15-Superagonisten durch NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen bestätigt werden. Weiterhin konnte die biologische Aktivität von sekretiertem RD-IL15 nachgewiesen werden. So führte die Kultivierung der IL-2-abhängigen CTTL-2-Zelllinie im Überstand RD-IL15-sekretierender CAR-NK-92-Zellen zu einem Wachstumsvorteil gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Des Weiteren wurde in Transwell-Experimenten die parakrine Stimulation primärer Immunzellen durch ko-kultivierte NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass RD-IL15 in ausreichender Menge sekretiert wird, um die Zytotoxizität primärer Immunzellen gegenüber der Tumorzelllinie K562 zu erhöhen. Außerdem führte die Stimulation durch sekretiertes RD-IL15 sowohl als alleinigen Stimulus als auch zusätzlichen Stimulus in einer Alloreaktion zu einer gesteigerten Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen und $CD3^+CD56^+$ NK-Zellen. RD-IL15-sekretierende CAR-NK-92-Zellen zeigten jedoch im Gegensatz zu exogen zugegebenem huIL-15 keinen signifikanten Effekt auf die Ausbildung von T-Gedächtniszellen.

4.4 Generierung und Charakterisierung eines GD₂-spezifischen Antikörperperfusionsproteins

4.4.1 Produktion und Aufreinigung des GD₂-spezifischen Miniantikörpers

Zur möglichen Steigerung der Antitumoraktivität von Immunzellen gegenüber GD₂-exprimierenden Krebszellen solider Tumoren wurde in dieser Arbeit ein weiterer Ansatz unter Verwendung eines Antikörperperfusionsproteins verfolgt. Für dessen Generierung wurde ein GD₂-spezifisches scFv-Antikörperfragment des humanisierten Antikörpers hu14.18 über eine *hinge*-Region an den N-Terminus eines IgG1-Fc-Teils fusioniert (siehe Abb. 4.22, A). Dieser setzt sich aus den konstanten Domänen CH₂ und CH₃ zusammen. Der resultierende hu14.18-Fc Miniantikörper soll über das GD₂-

spezifische Antikörperfragment hu14.18 an Zielantigen-exprimierende Tumorzellen und über IgG1 an den niedrig-affinen Fc-Rezeptor FcγRIIIa (CD16a) von Immunzellen binden. Die hierbei entstehende Vernetzung von Effektor- und Zielzellen erlaubt die Aktivierung von CD16 und hierdurch die Tumorzelllyse über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC*).

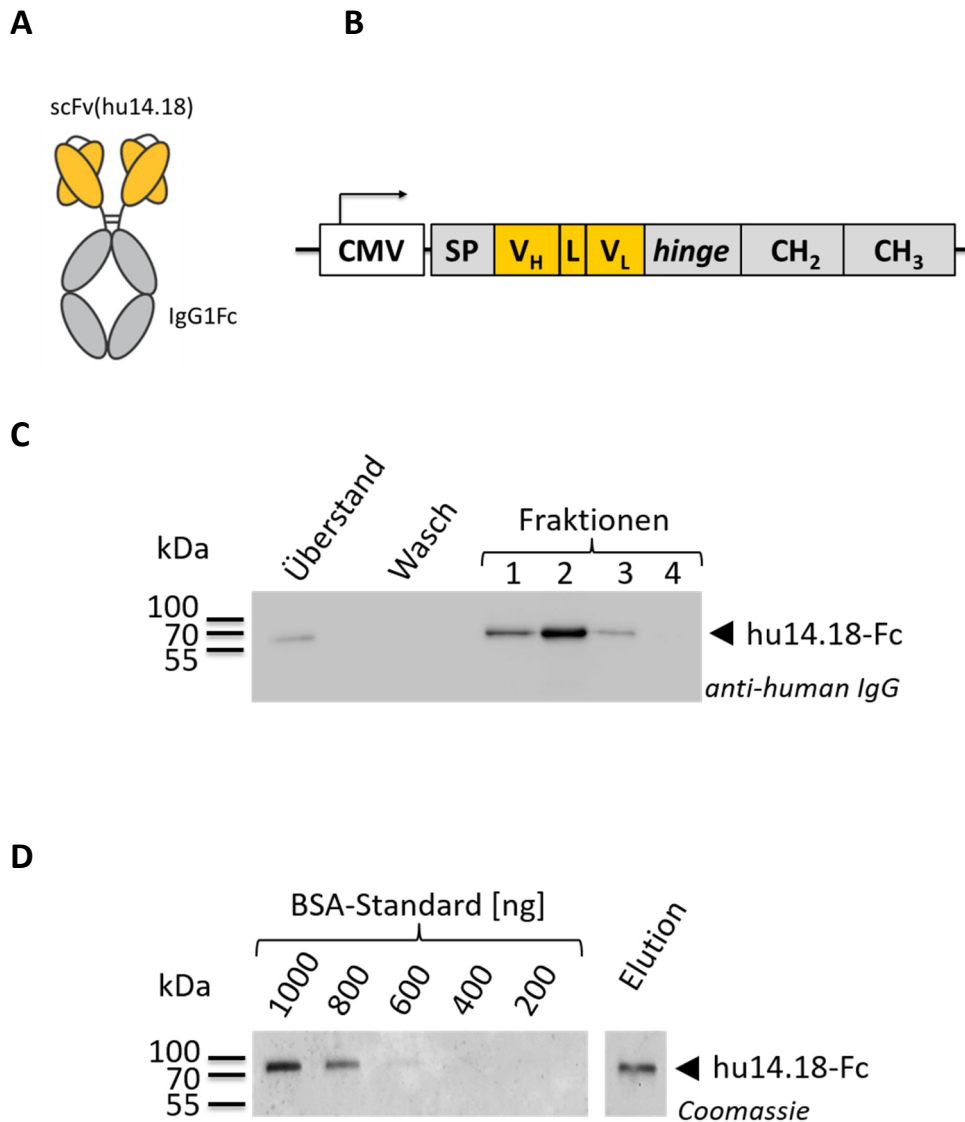


Abbildung 4.22: Generierung des rekombinanten hu14.18-Fc Miniantikörpers. (A) Aufbau des hu14.18-Fc Miniantikörpers. Das Antikörperperforationsprotein setzt sich aus dem scFv-Antikörperperforationsprotein, welches sich von den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette des humanen GD₂-spezifischen Antikörpers 14.18 ableitet, zusammen. Dieses ist über eine von IgG1 abgeleitete *hinge*-Region mit den konstanten Domänen CH₂ und CH₃ des humanen Immunglobulin G1 (IgG1) verbunden. **(B) Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsplasmids pcDNA3-scFv(hu14.18)-IgG1Fc.** Die cDNA des hu14.18-Fc Miniantikörpers wurde in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 in V_H-V_L-Orientierung unter Kontrolle des CMV-Promotors eingebracht. Anschließend erfolgte die stabile Transfektion von HEK293-Zellen mit pcDNA3-

Ergebnisse

scFv(hu14.18)-IgG1Fc zur Expression des Antikörperfusionsproteins. **(C) Aufreinigung und (D) Quantifizierung des hu14.18-Fc Miniantikörpers.** Nach Aufreinigung wurden die Eluate der Affinitätsäule mittels reduzierender SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Kontrolle wurden parallel nicht aufgereinigter Zellkulturüberstand und die Waschfraktion mitgeführt. Im Anschluss daran wurden unter Verwendung eines HRP-gekoppelten anti-human IgG-Antikörpers die hu14.18-Fc-enthaltenden Fraktionen ermittelt, vereinigt und über Nacht dialysiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Konzentration des Antikörpers anhand reduzierender SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich zu einer BSA-Standard-Verdünnungsreihe bestimmt. CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, L: GS-Linker, hinge: IgG1-abgeleitete hinge-Region.

Für die Produktion des Miniantikörpers hu14.18-Fc wurde dessen cDNA in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 unter Kontrolle des CMV-Promotors kloniert, welches im Anschluss daran stabil in HEK293-Zellen transfiziert wurde (siehe Abb. 4.22, B). Zellkulturüberstände der transfizierten HEK293-Zellen wurden gesammelt, aus denen anschließend das sekretierte Antikörperfusionsprotein mittels Affinitätschromatographie mit einer Protein-G-Säule aufgereinigt wurden. Es folgte eine reduzierende SDS-PAGE und eine Detektion des Proteins im Immunoblot, um die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an Miniantikörper zu überprüfen (siehe Abb. 4.22, C). Zudem wurden der nicht aufgereinigte Zellkulturüberstand und die Waschfraktion, welche ungebundene Komponenten enthielt, aufgetragen. Es zeigten sich sowohl im Überstand wie auch im Eluat der Affinitätsreinigung von Fraktion 1 bis 3 Proteinbanden, welche dem Antikörperfusionsprotein hu14.18-Fc mit einer molekularen Masse von etwa 55 kDa entsprachen. In der aufgetragenen Waschfraktion konnte hingegen keine Bande detektiert werden. Hu14.18-Fc-enthaltende Eluat-Fraktionen wurden daraufhin vereinigt und über Nacht gegen DPBS (1x) dialysiert. Mit Hilfe einer BSA-Standard-Verdünnungsreihe wurde am darauffolgenden Tag mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung die Konzentration des aufgereinigten Miniantikörpers bestimmt (siehe Abb. 4.22, D). Hierbei wurde eine Konzentration von 25,8 ng/μl ermittelt. Anschließend wurde eine mögliche Dimerbildung des hu14.18-Fc-Miniantikörpers untersucht. Hierfür wurde das gereinigte Fusionsprotein mittels SDS-PAGE unter reduzierenden beziehungsweise nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss daran im Immunoblot analysiert (siehe Abb. 4.23).

Ergebnisse

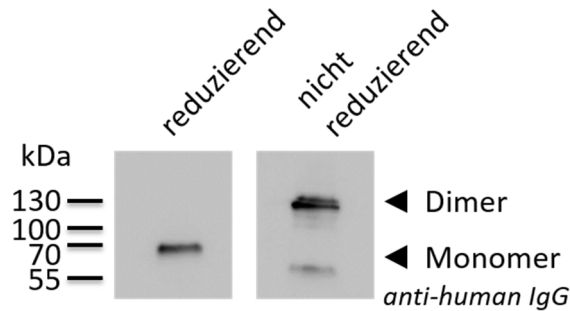


Abbildung 4.23: Dimerbildung des hu14.18-Fc Miniantikörpers. Der hu14.18-Fc Miniantikörper wurde unter reduzierenden beziehungsweise nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran erfolgte eine Immunoblot-Analyse mit einem HRP-gekoppelten Antikörper spezifisch für humanes IgG.

Hierbei wurde sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen eine Bande von etwa 55 kDa detektiert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde zudem eine weitere Bande von etwa 120 bis 130 kDa beobachtet, die einem Homodimer des Antikörperfusionsproteins entspricht.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung des hu14.18-Fc Miniantikörpers

In den darauffolgenden Experimenten wurde die Funktionalität des hu14.18-Fc Miniantikörpers untersucht. Zunächst wurde die spezifische Bindung des Antikörperfusionsproteins an GD₂-exprimierende humane und murine Zelllinien überprüft. Hierfür wurden die GD₂-positive humane Neuroblastomzelllinie UKF-NB3 und die murine Lymphomzelllinie EL4 mit dem hu14.18-Fc Miniantikörper versetzt und im Anschluss daran mit einem Sekundärantikörper spezifisch für humanes IgG-Fc gefärbt. Als Kontrollen wurden sowohl die GD₂-negative humane erythroleukämische Zelllinie K562 sowie die murine Glioblastomzelllinie GL261 mit dem Antikörperfusionsprotein beziehungsweise dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse (siehe Abb. 4.24). Hierbei konnte eine spezifische Bindung des hu14.18-Fc Miniantikörpers an GD₂-exprimierende, jedoch nicht an GD₂-negative Tumorzellen bestätigt werden.

Ergebnisse

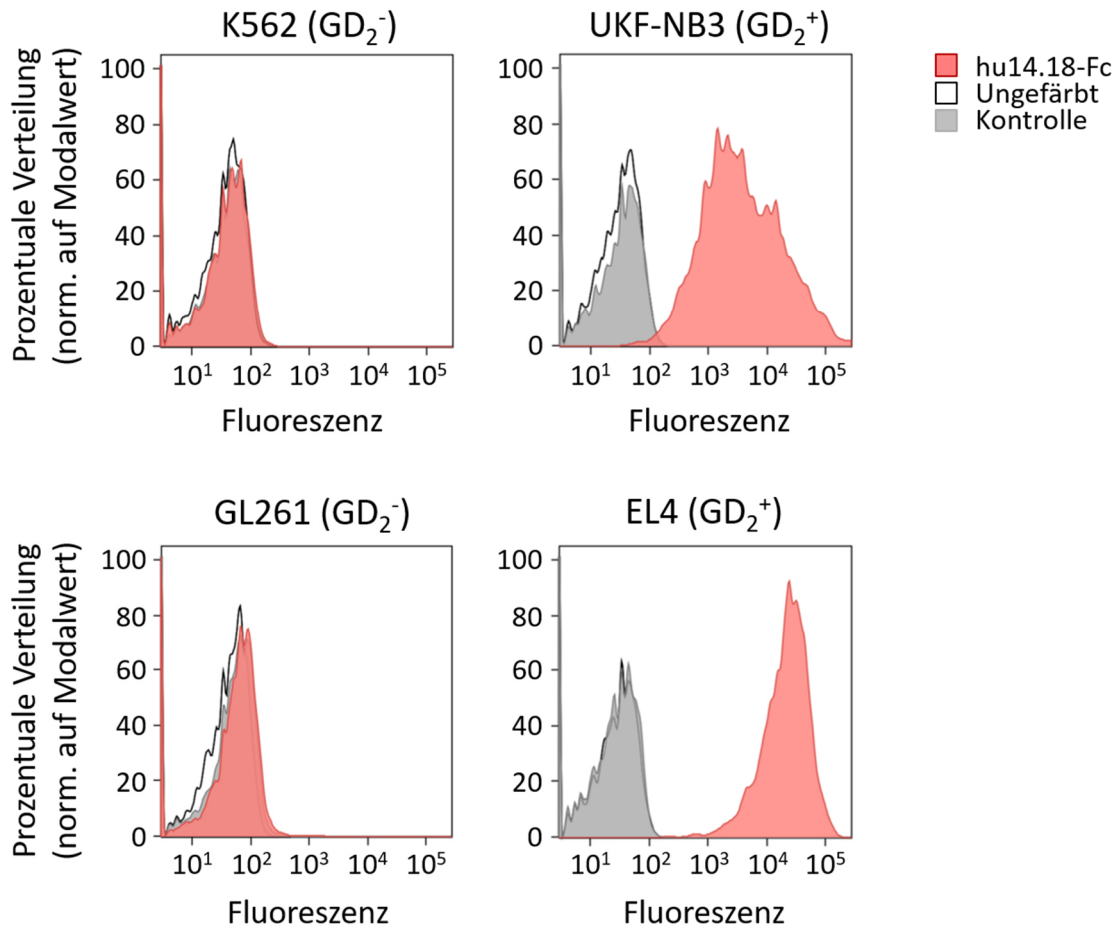


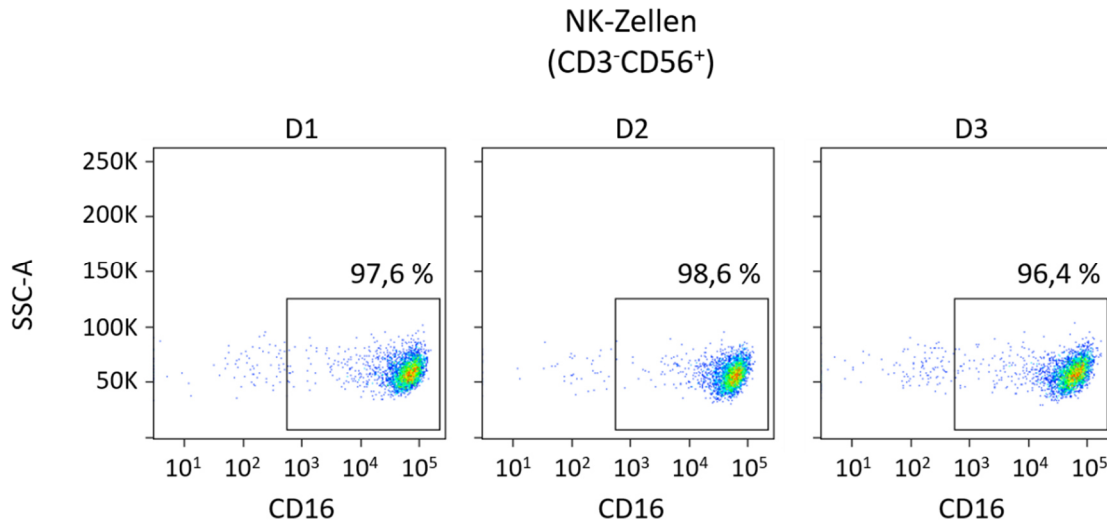
Abbildung 4.24: Analyse der Bindung des hu14.18-Fc Miniantikörpers an GD₂-positive Tumorzellen. GD₂-exprimierende UKF-NB3- und EL4-Zellen sowie GD₂-negative K562- und GL261-Zellen wurden mit 12,5 nM des Antikörperperfusionsproteins inkubiert. Die Detektion des gebundenen Miniantikörpers erfolgte mit einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für humanes IgG-Fc (rote Fläche). Ungefärbte Zellen (schwarze Linie) und nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen (graue Fläche) wurden als Kontrollen mitgeführt.

Im nachfolgenden Experiment wurde ein möglicher Effekt des hu14.18-Fc Miniantikörpers auf die ADCC-vermittelte Lyse Antigen-exprimierender Krebszellen unter Verwendung FcγRIIIa-positiver NK-Zellen untersucht. Hierfür wurden zunächst NK-Zellen gesunder Spender mittels des *RosetteSep™ Human NK Cell Enrichment Cocktails* (STEMCELL™) nach Herstellerangaben isoliert und mit Antikörpern spezifisch für humanes CD3, CD16 und CD56 durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 4.25, A). Es zeigte sich innerhalb der NK-Zellpopulationen (CD3⁺CD56⁺) dreier Spender ein hoher Anteil CD16-positiver Zellen, der zwischen 96,4 % und 98,6 % lag. Im Anschluss daran wurde die stimulierende Wirkung des hu14.18-Fc Miniantikörpers auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen derselben Spender gegenüber der GD₂-positiven Tumorzelllinie EL4 untersucht. Hierfür wurden Calcein Violet (CV)-gefärbte EL4-Zellen mit primären NK-Zellen in Effektor (*Effector*)- zu Zielzell (*Target*) (E:T)-Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 vermischt, mit dem hu14.18-Fc Miniantikörper versetzt und für 4 h bei 37 °C ko-inkubiert. In parallelen Ansätzen erfolgte die Ko-Kultivierung von

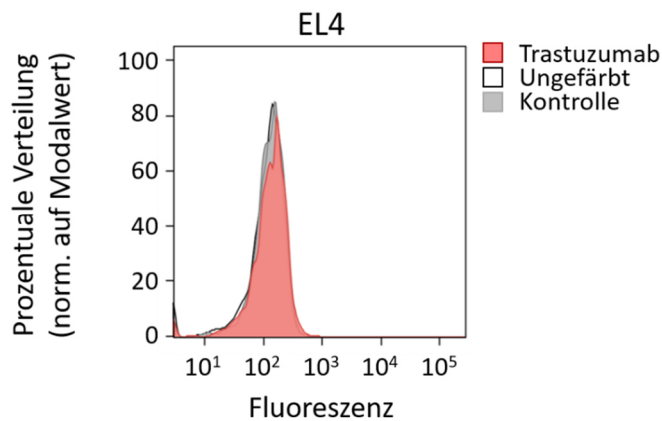
Ergebnisse

EL4- und primären NK-Zellen ohne Antikörperfusionsprotein beziehungsweise in Anwesenheit eines ebenfalls IgG1-basierten Kontroll-Antikörpers, welcher ErbB2-spezifisch ist und somit nicht von Zielzellen gebunden werden kann (Trastuzumab) (siehe Abb. 4.25, B). Anschließend wurden die jeweiligen Zellsuspensionen in PI-Lösung aufgenommen und der Anteil lysierter Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 4.25, C). Die erhaltenen Ergebnisse zeigten in Abwesenheit des Miniantikörpers eine moderate Lyse von EL4-Zellen durch primäre NK-Zellen von $35,6 \% \pm 5,4 \%$ (E:T = 10:1). Während die Zugabe von Trastuzumab keinen zusätzlichen Effekt auf die Antitumoraktivität der Effektorzellen hatte ($35,3 \% \pm 5,2 \%$; E:T = 10:1), führte die Inkubation mit dem hu14.18-Fc Miniantikörper dagegen zu einer signifikanten Steigerung des Anteils lysierter EL4-Zellen auf $60,0 \% \pm 6,7 \%$ CV/PI-doppelt-positiver Zellen (E:T = 10:1).

A



B



C

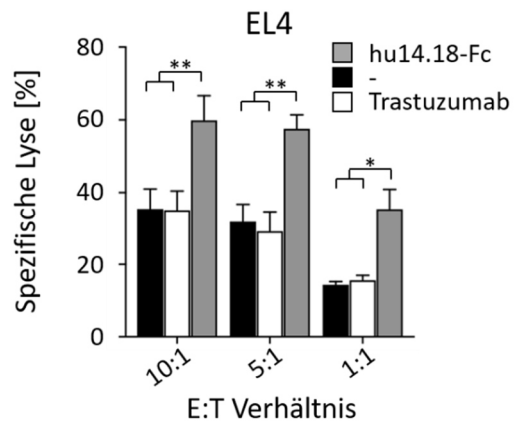


Abbildung 4.25: Stimulatorische Wirkung des hu14.18-Fc Miniantikörpers auf die zytotoxische Aktivität primärer NK-Zellen gegenüber GD₂-positiven EL4-Zellen. (A) Oberflächenexpression von CD16 auf primären NK-Zellen. Primäre NK-Zellen dreier gesunder Spender (D1-3) wurden nach Isolierung mittels eines Antikörpers spezifisch für CD16 durchflusszytometrisch untersucht. Ungefärbte NK-Zellen dienten als Negativkontrolle zur Einstellung des FACS-Gatings. **(B) Analyse der Bindung von Trastuzumab an EL4-Zellen.** 5 × 10⁵ EL4-Zellen wurden mit 12,5 nM des ErbB2-spezifischen, IgG1-basierten Antikörpers Trastuzumab inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mittels eines APC-gekoppelten Sekundärantikörpers spezifisch für humanes IgG-Fc (rote Fläche). Ungefärbte Zellen (schwarze Linie) und nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen (graue Fläche) wurden als Kontrollen mitgeführt. **(C) Stimulation der ADCC-vermittelten Lyse von EL4-Zellen in Gegenwart des hu14.18-Fc Miniantikörpers.** Primäre NK-Zellen wurden mit GD₂-positiven EL4-Zellen für 4 h in E:T-Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 in Anwesenheit von hu14.18-Fc ko-inkubiert (graue Balken). Anschließend wurde der prozentuale Anteil lysierter EL4-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Miniantikörper (schwarze Balken) oder mit dem ErbB2-spezifischen Antikörper Trastuzumab (weiße Balken) mitgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Experimente mit NK-Zellen unterschiedlicher Spender. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, dass der hu14.18-Fc Miniantikörper durch die Rekrutierung CD16-positiver NK-Zellen zu GD₂-positiven EL4-Zellen die ADCC-vermittelte Lyse Antigen-exprimierender Tumorzellen stimuliert.

4.4.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2

In den in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Experimenten wurde ein rekombinanter hu14.18-Fc Miniantikörper erfolgreich in stabil transfizierten HEK293-Zellen produziert und aufgereinigt. Mittels Immunoblot wurde nachgewiesen, dass der aufgereinigte hu14.18-Fc Miniantikörper überwiegend als Homodimer vorlag. Bei der anschließenden funktionellen Charakterisierung (Abschnitt 4.4.2) zeigten durchflusszytometrische Analysen eine spezifische Bindung des hu14.18-Fc Miniantikörpers sowohl an humane wie auch murine GD₂-exprimierende Zelllinien. Nachfolgend wurde der stimulierende Effekt des Antikörpers auf primäre NK-Zellen im Rahmen eines Zytotoxizitätsassays überprüft. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse verdeutlichten, dass hu14.18-Fc in der Lage ist, über seinen IgG1-Fc-Teil die ADCC-vermittelte Lyse GD₂-exprimierender Tumorzellen zu induzieren.

4.5 Analyse der *in vivo* Antitumoraktivität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen in NSG-Mäusen

4.5.1 Neuroblastom-Xenograftmodell

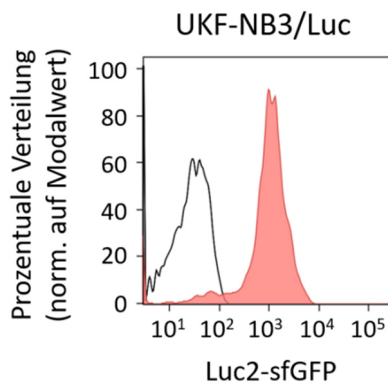
Nach erfolgter *in vitro* Charakterisierung GD₂-zielgerichteter NK-92-Zellen wurde deren Antitumoraktivität und ein möglicher stimulatorischer Effekt von RD-IL15 *in vivo* untersucht. Als Zielzelllinie diente hierbei die GD₂-exprimierende, NK-Zell-sensitive Neuroblastom-Zelllinie UKF-NB3, die zur späteren Detektion des Tumorwachstums mittels lentiviraler Transduktion mit einem Luciferase-Konstrukt modifiziert wurde. Der hierzu verwendete Vektor S-luc-GFP-W kodiert unter der Kontrolle des SFFV-Promoters für die *Firefly*-Luciferase *Luc2*, gefolgt von einer T2A-Sequenz und sfGFP (*Superfolder* GFP) als Marker. Nach Herstellung VSV-G-pseudotypisierter lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T-Zellen wurden UKF-NB3-Zellen mit Viruspartikel-haltigem Überstand transduziert. Anhand der sfGFP-Expression wurden die resultierenden UKF-NB3/Luc-Zellen sortiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 4.26, A).

Als Modellorganismus für die nachfolgenden *in vivo* Experimente dienten NSG-Mäuse, welche aufgrund zweier Gendefekte nicht über funktionsfähige B-, T- und NK-Zellen verfügen [Shultz et al., 1995]. Dies verhindert die Abstoßung inokulierter xenogener Zellen und erlaubt, die Antitumoraktivität injizierter NK-92-Zellen ohne einen möglichen zusätzlichen Effekt des endogenen

Ergebnisse

Immunsystems der Tiere zu untersuchen. Für das metastatische Neuroblastom-Modell wurden jeweils 1×10^6 UKF-NB3/Luc-Zellen in 100 μ l DPBS (1x) in die Schwanzvene von neun Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen injiziert (siehe Abb. 4.26, B). 23 Tage nach Tumorinokulation wurde mit der Behandlung begonnen, wobei tumortragenden Mäusen einmal wöchentlich für vier Wochen je 1×10^7 parentale NK-92-Zellen oder RD-IL15 sekretierende CAR-NK-92-Zellen intravenös verabreicht wurden. Zur Kontrolle wurde fünf Mäusen zellfreies Injektionsmedium injiziert. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen mittels *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung (*Bioluminescence imaging*, BLI) überwacht.

A



B

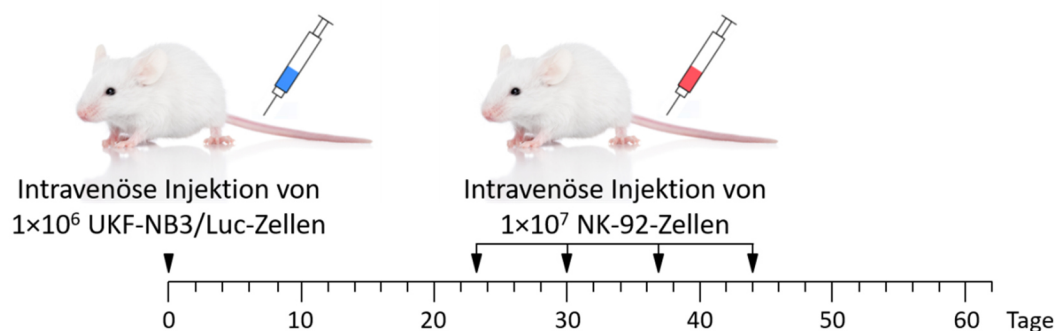


Abbildung 4.26: Behandlungsschema für das metastatische Neuroblastom-Xenograftmodell in NSG-Mäusen.

(A) UKF-NB3-Zellen wurden unter Verwendung des Vektors S-luc-GFP-W, welcher für die *Firefly*-Luciferase *Luc2* und den Marker sfGFP (*Superfolder* GFP) kodiert, lentiviral transduziert. Der Anteil modifizierter Zellen wurde mittels der Expression von sfGFP bestimmt. **(B)** 1×10^6 Luciferase-exprimierende UKF-NB3-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvene neun Wochen alter, weiblicher NSG-Mäuse injiziert. Nach 23 Tagen wurde mit der Behandlung begonnen, wobei einmal wöchentlich für vier Wochen je 1×10^7 parentale NK-92- oder CAR-NK-92-Zellen intravenös verabreicht wurden. Als Kontrolle dienen Mäuse, welche lediglich mit zellfreiem Injektionsmedium (X-Vivo⁺⁺) behandelt wurden.

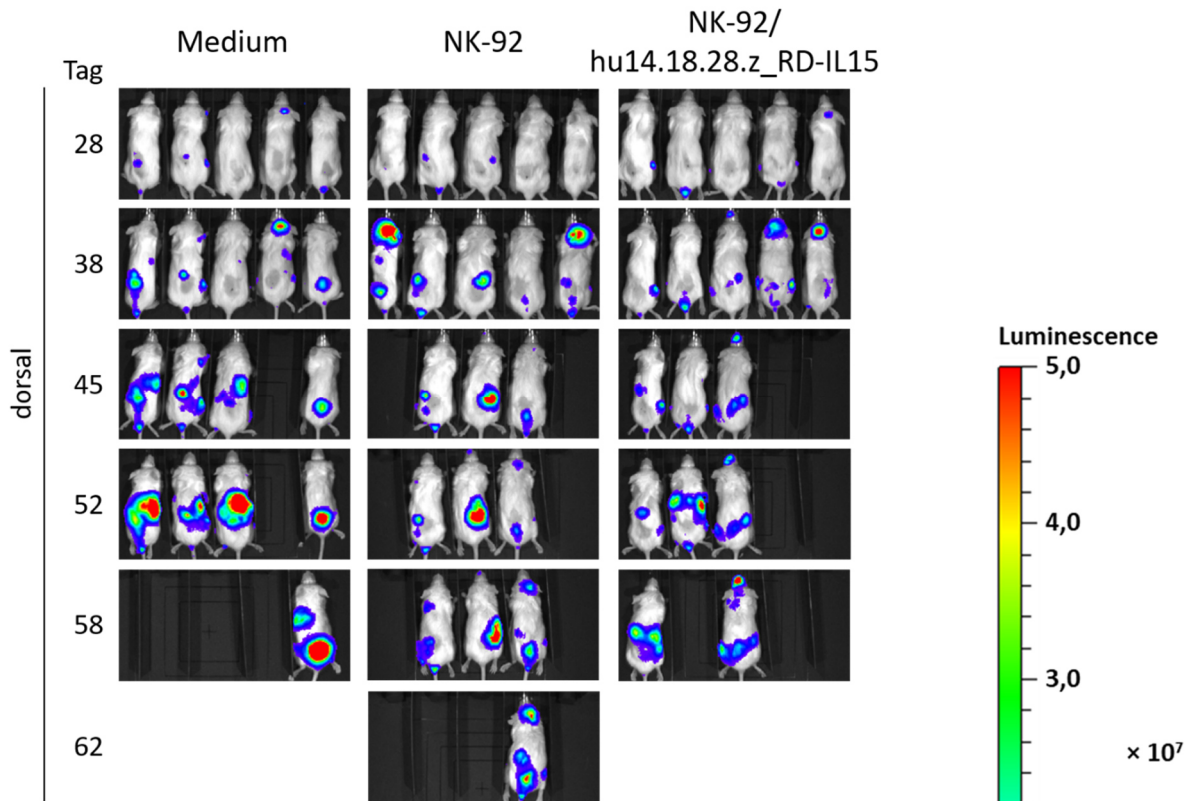
Ergebnisse

Hierfür wurde den Mäusen vor den jeweiligen Messungen D-Luciferin in einer Konzentration von 75 mg/kg subkutan injiziert. 20 min später erfolgte die Messung. Dabei wird im Rahmen einer Chemilumineszenz-Reaktion die Oxidation von D-Luciferin durch Luciferase induziert. Die daraus entstehende Lichtemission wurde am IVIS Lumina II nachgewiesen (siehe Abb. 4.27). Der sich aus UKF-NB3-Zellen entwickelnde Tumorphänotyp erwies sich innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen als heterogen. Die BLI-Messungen zeigten ein unterschiedlich ausgeprägtes Wachstum von Neuroblastom-Zellen unter anderem in Gelenken, der Leber, den Nieren und im Gehirn. Mäuse, welche frühzeitig einen Hirntumor entwickelten, mussten aufgrund des Erreichens vordefinierter Abbruchkriterien bereits während der Behandlungsphase zwischen Tag 38 und 42 euthanasiert werden. Die Kontrollgruppe (Medium) zeigte in der visuellen Analyse sowohl bei dorsaler (siehe Abb. 4.27, A) wie auch ventraler Ansicht (siehe Abb. 4.27, B) einen rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf.

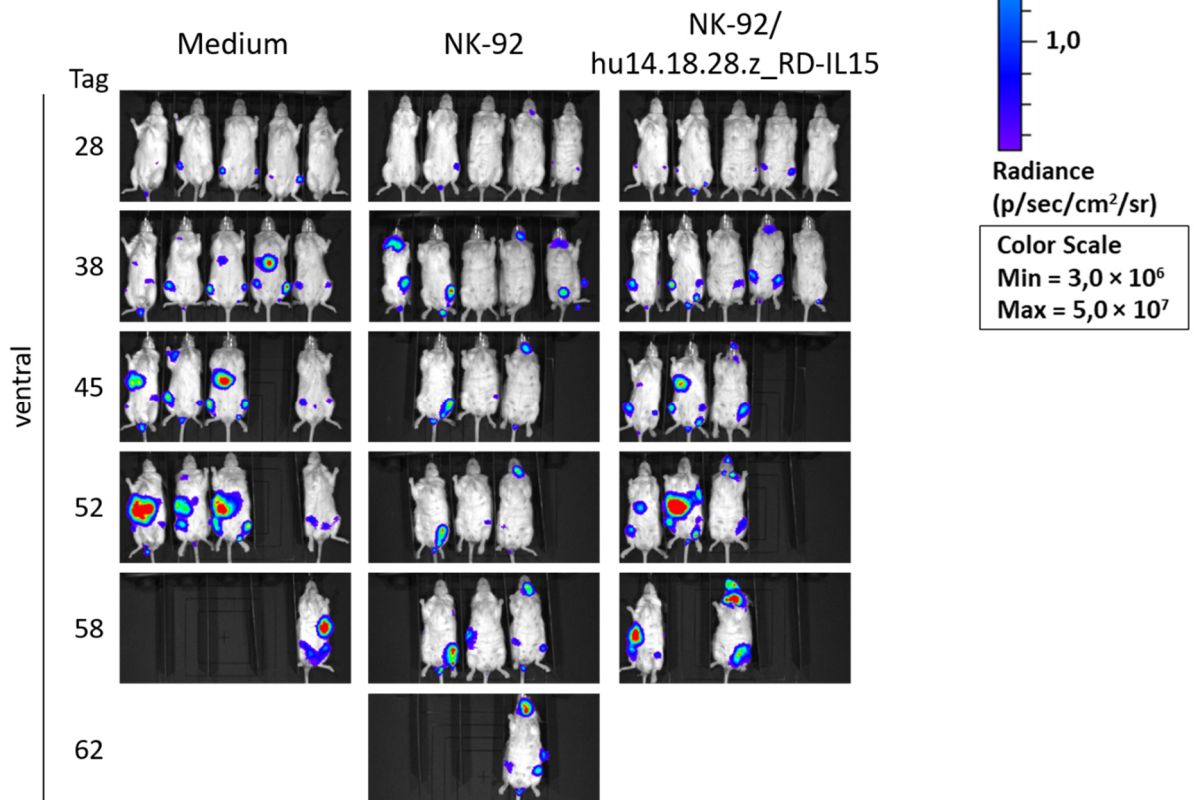
Dies konnte mittels Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals bestätigt werden, welches sich aus der Summe der gemessenen Strahlung der dorsalen und ventralen Aufnahme ergibt (siehe Abb. 4.27, C). Dargestellt ist die durchschnittliche Strahlung (*Average Radiance*). Bei den Mäusen der Kontrollgruppe (Injektionsmedium) wurde ab Tag 45 eine signifikante Steigerung des Biolumineszenzsignals beobachtet, welches an Tag 56 zwischen $7,1 \times 10^6$ und $4,9 \times 10^7$ p/s/cm²/sr betrug. Durch die Behandlung mit parentalen NK-92- oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen wurde dagegen eine partielle Kontrolle des Tumorwachstums erreicht. So ergab die Biolumineszenz-Messung von NSG-Mäusen, welchen parentale NK-92-Zellen verabreicht wurden, an Tag 56 Werte zwischen $1,8 \times 10^6$ und $7,2 \times 10^6$ p/s/cm²/sr. Im Fall der mit NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen behandelten Gruppe wiesen zwei der drei an Tag 56 verbliebenen Mäuse eine durchschnittliche Strahlung von $4,8 \times 10^6$ beziehungsweise $5,7 \times 10^6$ p/s/cm²/sr auf. Eine weitere Maus (Maus 2) zeigte eine rapide Bildung von Lebermetastasen, verdeutlicht durch das verstärkte Biolumineszenzsignal im Leberareal an Tag 52 (siehe Abb. 4.27, B). An Tag 56 wurde dieses Tier bei einem Wert von $5,3 \times 10^7$ p/s/cm²/sr aufgrund des Erreichens vordefinierter Abbruchkriterien euthanasiert.

Ergebnisse

A



B



C

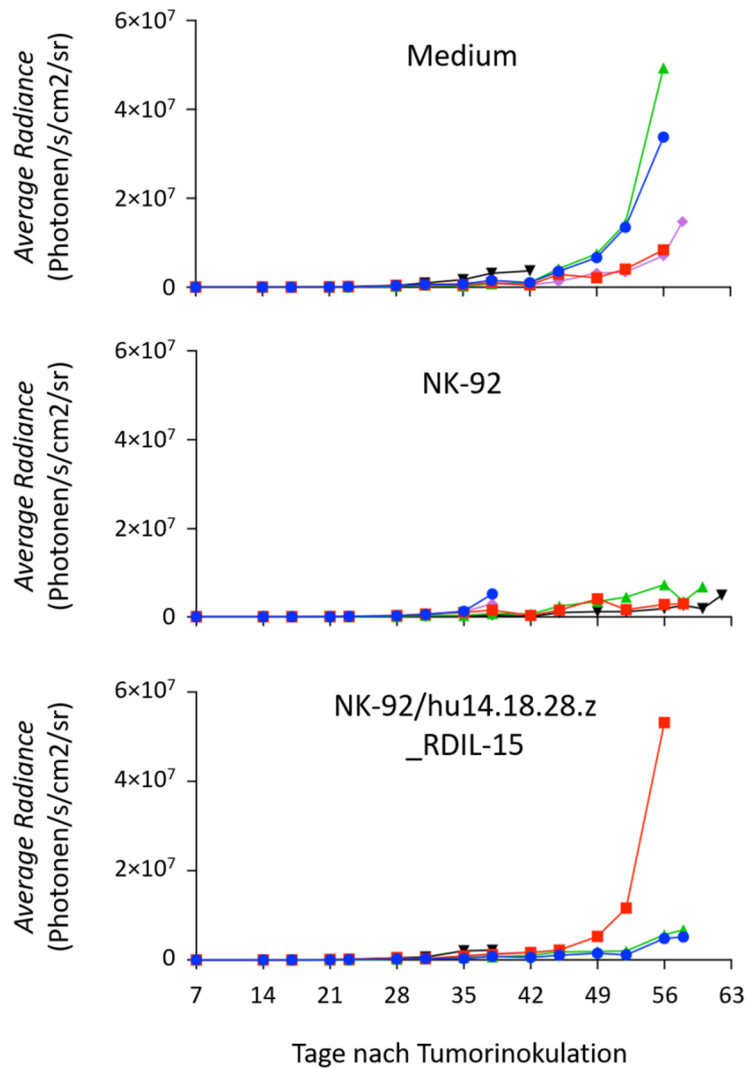


Abbildung 4.27: Systemische Behandlung des metastatischen UKF-NB3-Neuroblastoms in NSG-Mäusen mit parentalen oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen. Neun Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen wurden an Tag 0 1×10^6 Luciferase-exprimierende UKF-NB3-Neuroblastomzellen intravenös in die Schwanzvene injiziert (Behandlungsschema siehe Abb. 4.26). Das Tumorstadium wurde daraufhin in regelmäßigen Abständen mittels Biolumineszenz-Messung am IVIS Lumina II überprüft. Gezeigt sind (A) dorsale beziehungsweise (B) ventrale Aufnahmen der drei Behandlungsgruppen (jeweils 5 Tiere pro Gruppe) an Tag 28, 38, 45, 52, 58 und 62 des Experiments bei einer Belichtungszeit von 10 s. (C) Die Quantifizierung des Biolumineszenzsignals der einzelnen Mäuse erfolgte anhand der Messung der *Average Radiance* (Durchschnittliche Strahlung, p/s/cm²/sr). Die dargestellten Werte der jeweiligen Einzeltiere ergeben sich aus der Summe der gemessenen Werte der dorsalen und ventralen Aufnahmen.

Organe tumortragender Mäuse mit deutlichem Biolumineszenzsignal wurden nach Euthanasie entnommen und histologisch mittels einer H (Hämatoxylin)- und E (Eosin)-Färbung untersucht (siehe Abb 4.28). Dargestellt sind exemplarisch repräsentative Färbungen der Leber und des Gehirns von Maus 1 sowie der Niere von Maus 3 der NK-92-Gruppe. Die Gewebeschnitte der jeweiligen Organe wiesen Neuroblastom-Metastasen auf, die sich deutlich vom gesunden Gewebe abgrenzten.

Ergebnisse

Vergleichbare Effekte zeigten sich in den Organen von Tieren, die mit CAR-NK-92-Zellen oder Injektionsmedium behandelt wurden (Daten nicht gezeigt).

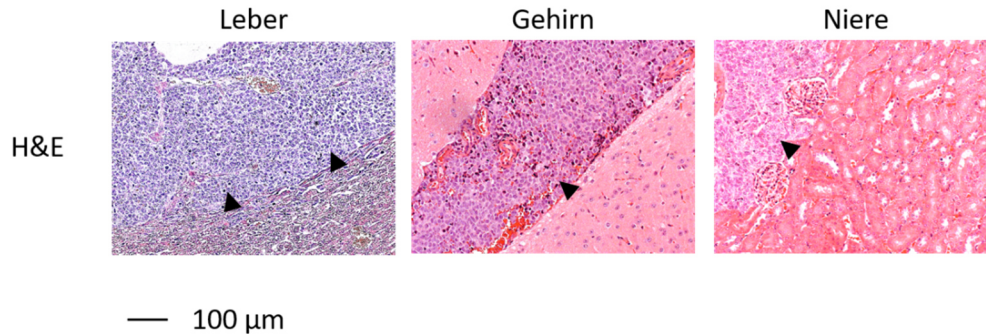


Abbildung 4.28: Histologische Untersuchung von Organen mit metastasiertem UKF-NB3-Neuroblastom. Organe symptomatischer NSG-Mäuse wurden entnommen und für 24 h in einer 4 % Formaldehydlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Herstellung von Gewebeschnitten und deren Färbung mittels einer Hämatoxylin- und Eosin-Lösung (HE-Färbung) zur Identifizierung malignen Gewebes (schwarzer Pfeil). Maßstab: 100 μm.

Trotz des bei den meisten Tieren nach Behandlung mit NK-92 oder CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle verzögerten Tumorwachstums wurde kein Unterschied im mittleren Überleben (Median) der Tiere festgestellt (siehe Abb. 4.29). Das mittlere Überleben der Mäuse, denen zellfreies Injektionsmedium oder NK-92/hu14.8.28.z_RD-IL15-Zellen verabreicht wurde, betrug jeweils 56 Tage. Die Gruppe, die mit parentalen NK-92-Zellen behandelt wurde, zeigte ein mittleres Überleben von 58 Tagen. Hierbei ist anzumerken, dass in der Kontrollgruppe (Injektionsmedium) eine und in beiden NK-92-Gruppen je zwei Mäuse bereits während der Behandlungsphase aufgrund des Erreichens gewählter Abbruchkriterien getötet werden mussten. Bei den betroffenen Mäusen wurde zu diesem Zeitpunkt ein deutliches Biolumineszenzsignal im Gehirn festgestellt (siehe Abb. 4.27, A).

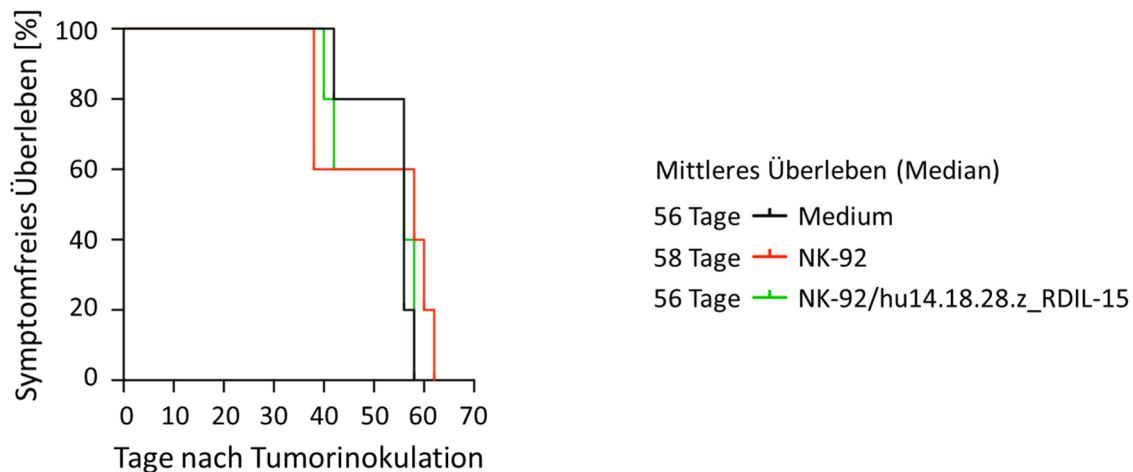


Abbildung 4.29: Symptomfreies Überleben UKF-NB3-Neuroblastom-tragender NSG-Mäuse nach Behandlung mit parentalen oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen. Gezeigt ist das symptomfreie Überleben der NSG-Mäuse aus dem in Abb. 4.27 dargestellten Experiment, welche nach Tumorzellinjektion wöchentlich für vier Wochen systemisch mit je 1×10^7 parentalen NK-92- oder CAR-NK-92-Zellen behandelt wurden. Der Kontrollgruppe wurde intravenös zellfreies Injektionsmedium verabreicht. Tiere, welche vordefinierte Abbruchkriterien erreichten, wurden unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation euthanasiert.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen somit im Vergleich zu parentalen NK-92-Zellen und mit Medium behandelten Tieren keinen Einfluss RD-IL15 sekretierender, GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen auf das Tumorstadium im systemischen Neuroblastom-Xenograftmodell in NSG-Mäusen.

4.5.2 Lymphom-Allograftmodell

In einem weiteren Tumormodell wurden EL4-Zellen zur Untersuchung der *in vivo* Antitumoraktivität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen eingesetzt. Die GD₂-exprimierende, murine Lymphom-Zelllinie ist gegenüber parentalen NK-92-Zellen nicht sensitiv, wurde jedoch *in vitro* von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen effizient abgetötet (Anteil lysierter EL4-Zellen bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 über 70 %, siehe Abb. 4.7, B). Wie beim vorherigen Tierexperiment wurden die Tumorzellen vor Injektion mit der *Firefly*-Luciferase *Luc2* modifiziert (EL4/Luc) (siehe Abb. 4.30, A). Anschließend wurde für das metastatische Lymphom-Modell zunächst ein Dosisfindungsexperiment durchgeführt, in welchem sechs bis acht Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen 1×10^5 , 5×10^5 oder 1×10^6 EL4/Luc-Zellen in 100 μ l DPBS (1x) intravenös verabreicht wurden. Das Tumorstadium wurde dann in regelmäßigen Abständen mittels BLI-Messungen überprüft (siehe Abb. 4.30, B). Ab Tag 9 wurde in allen Dosisgruppen eine deutliche Steigerung des Biolumineszenzsignals gemessen, die bei der niedrigsten Dosis eine Erhöhung von $6,9 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$ p/s/cm²/sr (Tag 9) auf $7,0 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ p/s/cm²/sr (Tag 14) betrug.

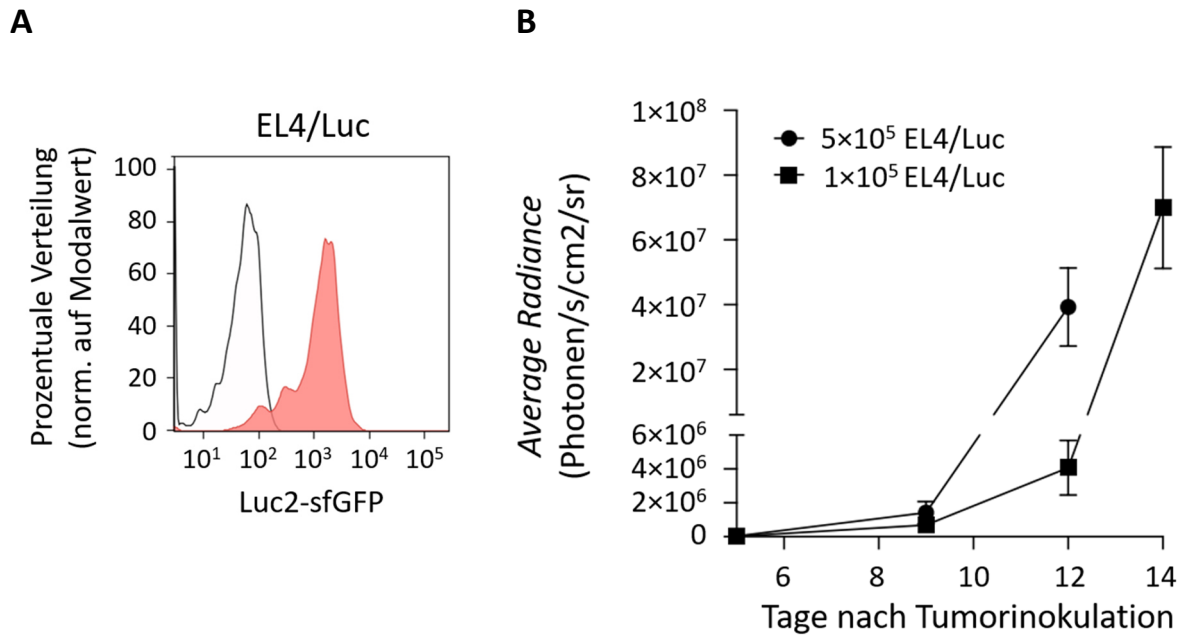
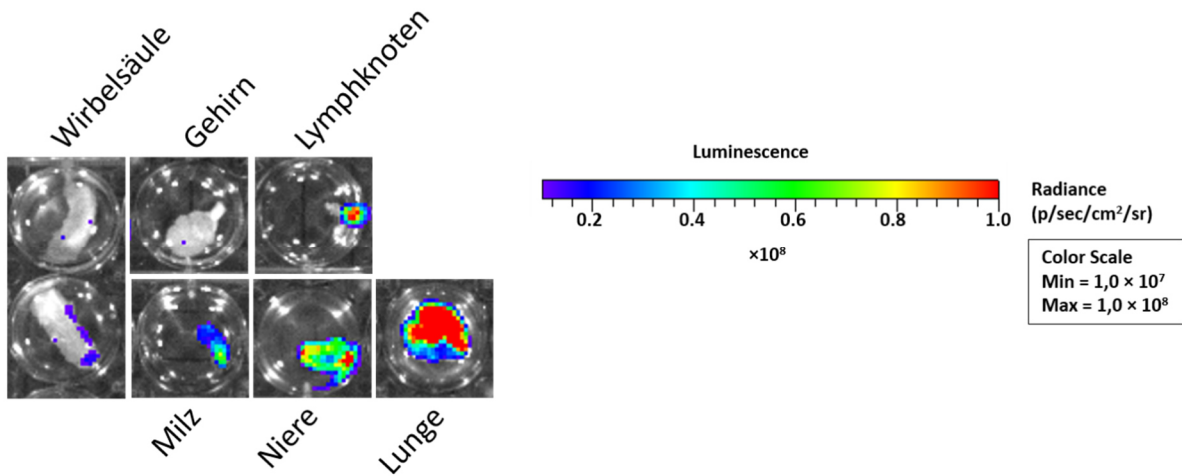


Abbildung 4.30: Dosisfindungsexperiment EL4/Luc-induzierter Lymphome in NSG-Mäusen. (A) EL4-Zellen wurden unter Verwendung des Vektors S-luc-GFP-W, welcher für die *Firefly*-Luciferase *Luc2* und den Marker sfGFP (*Superfolder* GFP) kodiert, lentiviral transduziert. Der Anteil modifizierter Zellen wurde mittels der Expression von sfGFP bestimmt. (B) Sechs bis acht Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen wurden an Tag 0 1×10^5 , 5×10^5 oder 1×10^6 EL4/Luc-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Deren *in vivo* Proliferation wurde daraufhin in regelmäßigen Abständen mittels Biolumineszenz-Messung am IVIS Lumina II überprüft und anhand der Messung der *Average Radiance* (Durchschnittliche Strahlung, p/s/cm²/sr) quantifiziert. Die Werte ergeben sich aus der Summe der gemessenen Werte der dorsalen und ventralen Aufnahmen. Dargestellt sind die Dosisgruppen, welchen 1×10^5 oder 5×10^5 EL4/Luc-Zellen verabreicht wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils vier Tieren pro Gruppe.

Zur Untersuchung der Tumorzellokalisierung wurden zwei Tieren aus der höchsten Dosisgruppe (1×10^6 EL4/Luc-Zellen) nach Euthanasierung an Tag 9 innere Organe, Femur und Wirbelsäule entnommen. Lymphknoten wurden hierbei als Teil des inguinalen Fettpolsters isoliert. Zur Messung der Biolumineszenz wurden diese jeweils in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte, in welche D-Luciferin in DPBS vorgelegt wurde, überführt (siehe Abb. 4.31, A). Es zeigte sich ein deutliches Biolumineszenz-Signal bei Organen wie Milz, Niere, Lunge und Lymphknoten. Bei der nachfolgenden Quantifizierung (siehe Abb. 4.31, B) wurden in allen entnommenen Proben Luciferase-exprimierende Tumorzellen nachgewiesen. In einem der beiden getesteten Tiere (Maus 2) hatten sich diese vor allem in der Lunge angereichert und führten dort zu einer durchschnittlichen Strahlung von $4,3 \times 10^7$ p/s/cm²/sr.

A



B

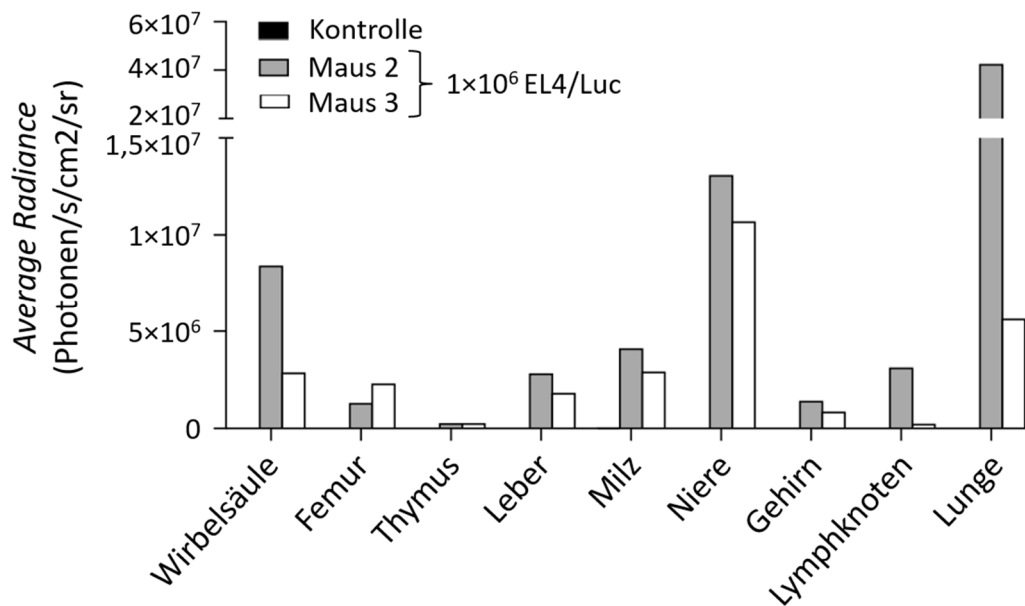


Abbildung 4.31: Lokalisation des metastatischen EL4-Lymphoms in inneren Organen, Femur und Wirbelsäule.

(A) Organe, Wirbelsäule und Femur symptomatischer NSG-Mäuse wurden entnommen und in eine 6-Well-Platte, in welche pro Vertiefung 300 µg/mL D-Luciferin in DPBS in einem Gesamtvolumen von 3 ml vorgelegt wurde, übertragen. Es folgte die Biolumineszenz-Messung am IVIS Lumina II bei einer Belichtungszeit von 10 s.

(B) Die Quantifizierung des Biolumineszenzsignals der einzelnen Proben erfolgte anhand der Messung der *Average Radiance* (Durchschnittliche Strahlung, p/s/cm²/sr). Als Kontrolle dienten Gewebe einer NSG-Maus, welche keine EL4/Luc-Zellen erhalten hatte.

Für das nachfolgende Behandlungsexperiment wurde aufgrund der schnellen Tumorprogression, welche ab Tag 9 exponentiell anstieg (siehe Abb. 4.30, B), die geringste Dosis von Tumorzellen sowie Tag 6 als Behandlungsbeginn gewählt. So wurden an Tag 0 sechs bis zwölf Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen jeweils 1×10^5 Luc-exprimierende EL4-Zellen intravenös verabreicht (siehe Abb. 4.32).

Ergebnisse

In der Behandlungsphase wurden tumortragenden Mäusen dann zweimal wöchentlich für vier Wochen je 1×10^7 parentale NK-92-Zellen oder GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen ohne beziehungsweise mit ektopischer RD-IL15-Expression in die Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, welchen zellfreies Injektionsmedium verabreicht wurde. Zur Überprüfung eines möglichen Effekts des IL-15-Superagonisten auf das Langzeitüberleben von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde dabei in den jeweiligen Gruppen DPBS ohne exogen zugegebenes IL-2 als Injektionsmedium verwendet.

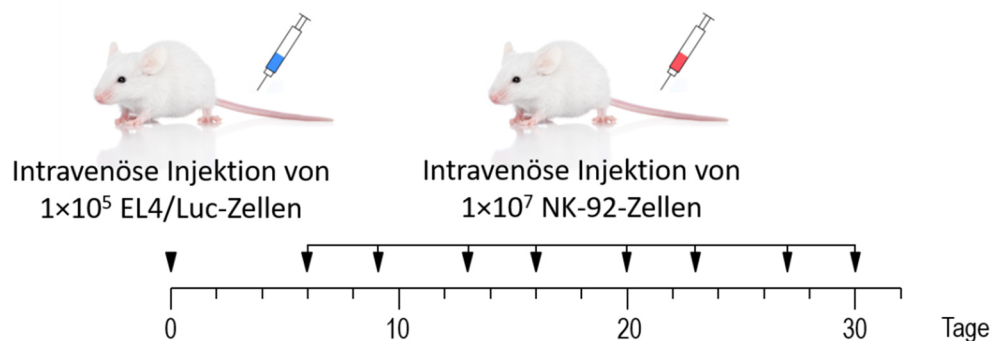
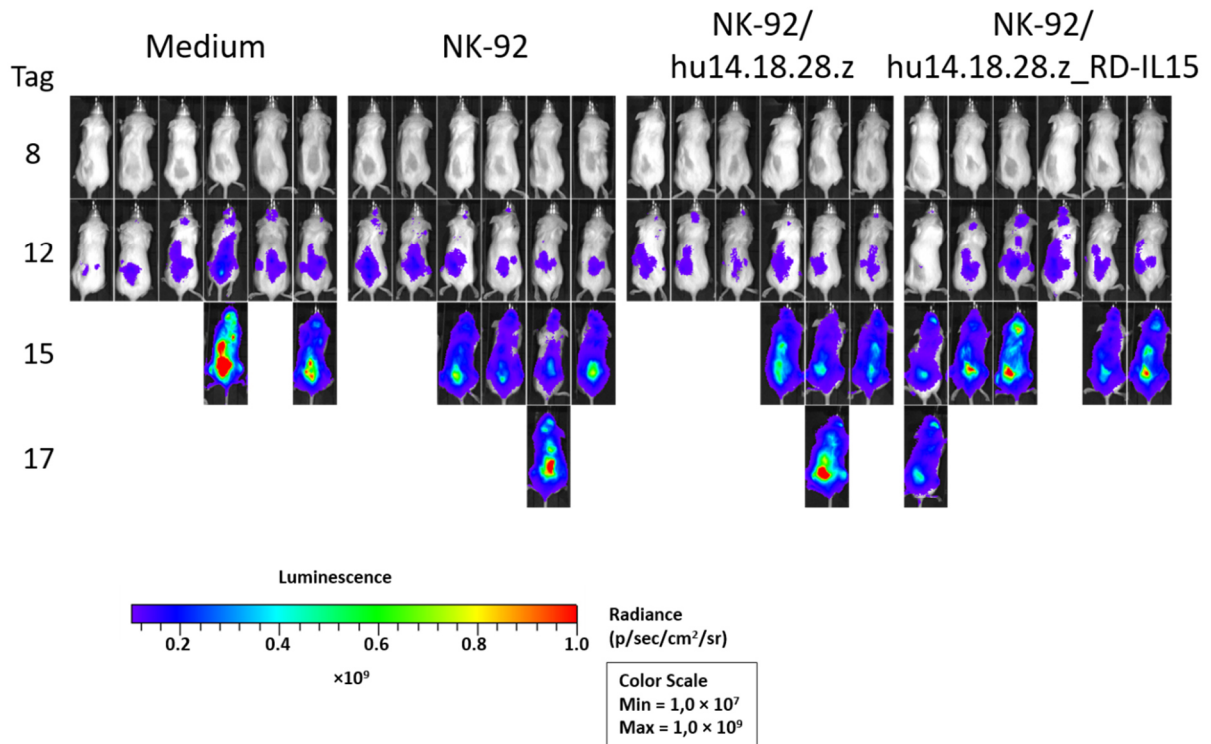


Abbildung 4.32: Behandlungsschema für das metastatische Lymphom-Allograftmodell in NSG-Mäusen. 1×10^5 Luciferase-exprimierende EL4-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvene sechs bis zwölf Wochen alter, weiblicher NSG-Mäuse injiziert. Nach 6 Tagen wurde mit der Behandlung begonnen, wofür zweimal wöchentlich für vier Wochen je 1×10^7 parentale NK-92- oder CAR-NK-92-Zellen intravenös verabreicht wurden. Als Kontrolle dienten Mäuse, welche lediglich mit zellfreiem Injektionsmedium (DPBS) behandelt wurden.

Wie im zuvor gezeigten Neuroblastom-Modell wurde das Wachstum metastasierender Tumorzellen nach subkutaner Injektion von D-Luciferin anhand des steigenden Biolumineszenz-Signals überprüft. Im Gegensatz zum vorherigen Neuroblastommodell resultierte die Injektion von EL4/Luc-Zellen in einer ähnlichen Verteilung der Tumorherde in den injizierten Mäusen (siehe Abb. 4.33, A). Ab Tag 12 wurde dabei in allen Gruppen eine erhebliche Tumorprogression festgestellt, so dass nach diesem Zeitpunkt bereits einige Tiere aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien euthanasiert werden mussten. Zunächst verbliebene Mäuse mussten ebenfalls noch innerhalb des Therapiezeitraums im Verlauf der folgenden 5 Tage getötet werden, wobei die Mehrheit dieser Tiere mit dem Tumorwachstum assoziierte Symptome wie Gewichtsverlust, Apathie und Lähmungserscheinungen an den Hinterbeinen aufwiesen.

A



B

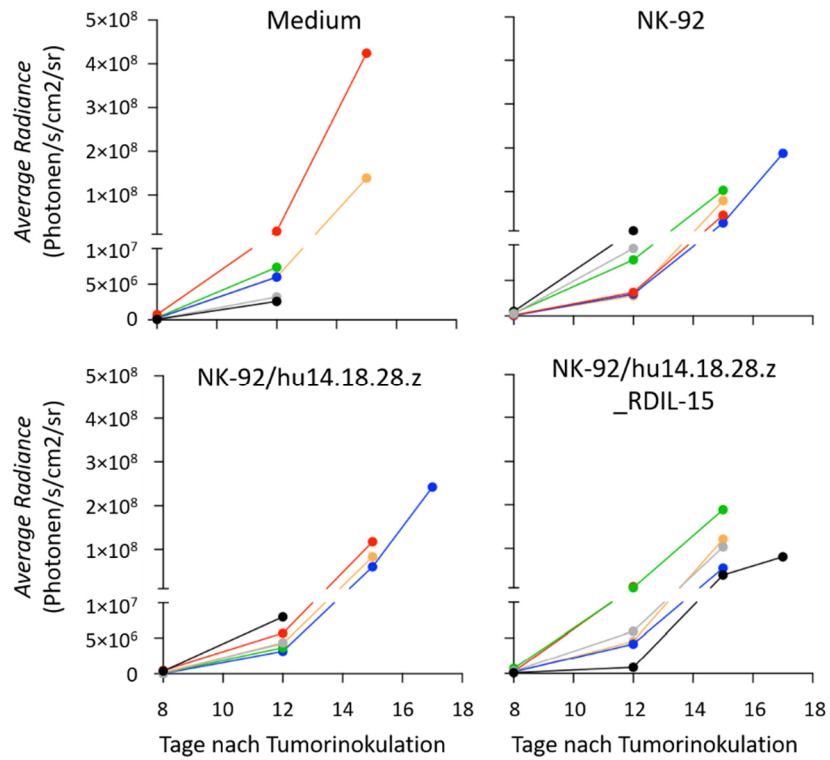


Abbildung 4.33: Systemische Behandlung des metastatischen EL4-Lymphoms in NSG-Mäusen mit parentalen oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen. (A) Sechs bis 12 Wochen alten, weiblichen NSG-Mäusen wurden an Tag 0 1×10^5 Luciferase-exprimierende EL4-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Das Tumorstadium

Ergebnisse

wurde daraufhin in regelmäßigen Abständen mittels Biolumineszenz-Messung am IVIS Lumina II überprüft. Gezeigt sind dorsale Aufnahmen der vier Gruppen (jeweils 6 Tiere pro Gruppe) an Tag 8, 12, 15 und 17 des Experiments bei einer Belichtungszeit von 1 s. **(B)** Die Quantifizierung des Biolumineszenzsignals der einzelnen Mäuse erfolgte anhand der Messung der *Average Radiance* (Durchschnittliche Strahlung, p/s/cm²/sr). Die dargestellten Werte der jeweiligen Einzeltiere ergeben sich aus der Summe der gemessenen Werte der dorsalen und ventralen Aufnahmen.

Eine deutlich geringere Belastung bei fortschreitendem Tumorwachstum konnte in den jeweiligen CAR-NK-92-Gruppen im Vergleich zu Mäusen, welche parentale NK-92-Zellen oder Injektionsmedium erhielten, optisch nicht festgestellt werden. Die Quantifizierung der Biolumineszenz-Signale bestätigte diese Beobachtung. An Tag 15 des Tierexperiments war die durchschnittliche Strahlung (*Average Radiance*) zwischen den einzelnen Gruppen, welchen intravenös NK-92- ($6,4 \times 10^7 \pm 3,3 \times 10^7$ p/s/cm²/sr, n = 4), NK-92/hu14.18.28.z- ($8,7 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$ p/s/cm²/sr, n = 3) oder NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen ($1,0 \times 10^8 \pm 0,6 \times 10^8$ p/s/cm²/sr, n = 5) injiziert wurden, vergleichbar (siehe Abb. 4.33, B). Bei den zwei an diesem Tag verbliebenen Mäusen, welchen Injektionsmedium verabreicht wurde, ergaben sich Werte von $4,2 \times 10^8$ beziehungsweise $1,4 \times 10^8$ p/s/cm²/sr. Ebenso war kein Unterschied im mittleren Überleben (Median) der Tiere der verschiedenen Gruppen festzustellen (siehe Abb. 4.34). Dieses betrug bei Mäusen, welche parentale NK-92-Zellen oder DPBS erhielten, 15 beziehungsweise 14 Tage. Die intravenöse Gabe von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen führte zu keinem verlängerten Überleben (14,5 und 15 Tage).

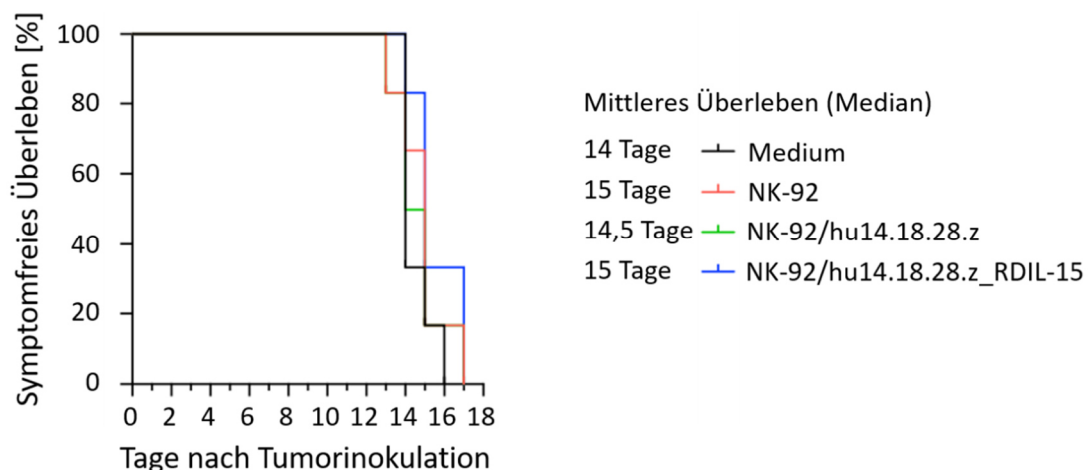
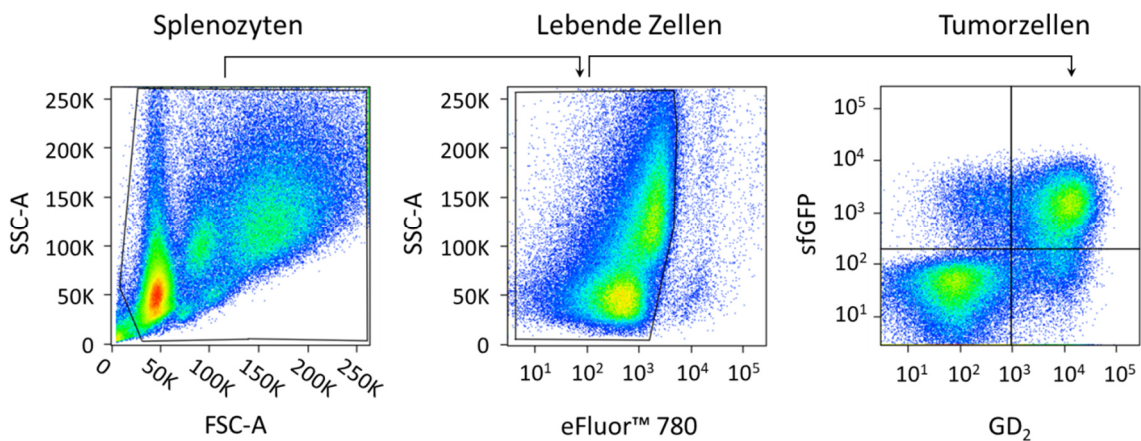


Abbildung 4.34: Symptomfreies Überleben EL4-Lymphom-tragender NSG-Mäuse nach Behandlung mit parentalen oder GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen. Gezeigt ist das symptomfreie Überleben der NSG-Mäuse aus dem in Abb. 4.33 dargestellten Experiment, welche nach Tumorzellinjektion zweimal wöchentlich systemisch mit je 1×10^7 parentalen NK-92- oder CAR-NK-92-Zellen behandelt wurden. Der Kontrollgruppe wurde intravenös zellfreies Injektionsmedium verabreicht. Tiere, welche zuvor definierte Abbruchkriterien erreichten, wurden unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet.

Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen dennoch einen möglicherweise geringen Einfluss auf das Tumorwachstum hatten, wurde in einem weiteren Schritt die Tumorlast der einzelnen Gruppen ermittelt. Hierfür wurde tumortragenden Mäusen nach Euthanasie die Milz, welche im Dosisfindungsexperiment ein deutliches Biolumineszenzsignal aufwies (siehe Abb. 4.31), entnommen und auf ihren Gehalt an Tumorzellen überprüft. Der prozentuale Anteil von EL4/Luc-Zellen innerhalb der Splenozyten-Population wurde dabei nach Dissoziation der Gewebe in Einzelzellsuspensionen anhand der Marker sfGFP und GD₂ durchflusszytometrisch ermittelt, wobei zwischen GD₂⁺sfGFP⁻, GD₂⁺sfGFP⁺ und GD₂⁻sfGFP⁺-Populationen unterschieden wurde (siehe Abb. 4.35, A).

A



B

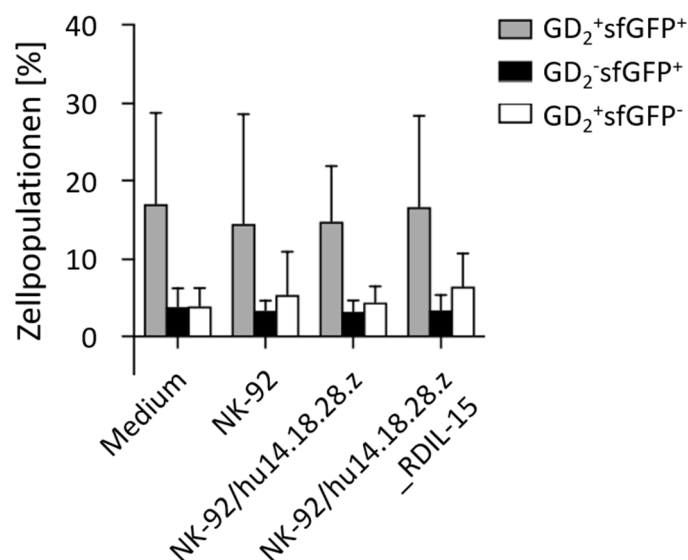


Abbildung 4.35: Durchflusszytometrische Analyse von Milzgewebe EL4-Lymphom-tragender NSG-Mäuse. (A) Nach Entnahme der Milzen tumortragender Mäuse wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und in diesen

Ergebnisse

anschließend der prozentuale Anteil an EL4-Zellen bestimmt. Anhand des Lebend-Tot-Markers eFluor™ 780 wurden zunächst die lebenden Zellen selektiert. Im Anschluss daran wurden mit einem GD₂-spezifischen Antikörper und anhand des sfGFP-Markers die prozentualen Anteile der EL4/Luc-Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. **(B)**. Es wurde zwischen GD₂⁺sfGFP⁻ (graue Balken), GD₂⁺sfGFP⁺ (weiße Balken) und GD₂⁻sfGFP⁺-Populationen (schwarze Balken) differenziert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD der jeweiligen Behandlungs- und Kontrollgruppen.

Sowohl die CAR-NK-92- als auch die Kontrollgruppen wiesen bei der Analyse vergleichbare Werte auf (siehe Abb. 4.35, B). So betrug der Anteil GD₂- und sfGFP-doppelt-positiver Zellen nach Behandlung mit parentalen NK-92-Zellen oder Injektionsmedium 14,6 % ± 14,1 % beziehungsweise 17,2 % ± 11,6 %. Die Behandlung mit NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen führte zu keiner Reduzierung der Tumorzellpopulation (14,9 % ± 7,1 % und 16,8 % ± 11,7 %). EL4/Luc-Zellen, welche eine Herunterregulation von GD₂ oder sfGFP aufwiesen, stellten dabei weniger als 10 % der Gesamtpopulation isolierter Milzzellen dar.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Therapie mit GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen im EL4/Luc-Tumormodell in NSG-Mäusen unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer verlangsamten Tumorprogression führt. Auch die Expression des IL-15-Superagonisten hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf Tumorwachstum oder Überleben der Tiere.

4.5.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 und 4.5.2

Die mögliche Antitumoraktivität der GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen *in vivo* wurde sowohl in einem metastatischen UKF-NB3-Neuroblastom-Xenograft- (4.5.1) als auch einem EL4-Lymphom-Allograftmodell (4.5.2) in NSG-Mäusen untersucht. Hierbei hatten tumortragende, mit CAR-NK-92-Zellen behandelte Mäuse unter den gewählten Bedingungen keinen Überlebensvorteil gegenüber den Gruppen, denen zellfreies Injektionsmedium beziehungsweise parentale NK-92-Zellen injiziert wurden. Im Neuroblastom-Xenograftmodell zeigte sich nach Quantifizierung der Biolumineszenzsignale jedoch eine Verlangsamung der Tumorprogression in einem Großteil der Mäuse der Gruppen, die wiederholt systemisch mit parentalen oder modifizierten NK-92-Zellen behandelt wurden. Dies wurde im Fall von EL4/Luc-induzierten Tumoren nach Behandlung mit NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen jedoch nicht beobachtet. Auch die durchflusszytometrische Analyse der Milzen tumortragender Mäuse zeigte eine gleich hohe Tumorlast von Behandlungs- (CAR-NK-92-Zellen) und Kontrollgruppen (NK-92-Zellen und Injektionsmedium). Ebenfalls konnte kein Einfluss von sekretiertem RD-IL15 auf den Krankheitsverlauf im Vergleich zu CAR-NK-92-Zellen ohne ektopische Expression des IL-15-Superagonisten festgestellt werden.

5 Diskussion

Die Behandlung solider Tumoren mittels CAR-modifizierter Lymphozyten als zielgerichtete Immuntherapien geht mit einigen Herausforderungen einher, wie beispielsweise einer erschwerten Migration und Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe, oder einem immunsuppressiven Tumormikromilieu (*Tumor microenvironment*, TME), das unter anderem durch Treg-Zellen, MDSCs (*Myeloid-derived suppressor cells*) und Liganden inhibitorischer Rezeptoren ausgebildet wird. Ein weiteres Hindernis stellt die heterogene Expression potenzieller Zielantigene dar [Marofi et al., 2021]. Entscheidend für eine erfolgreiche, zielgerichtete Therapie ist somit die Wahl eines passenden tumorassoziierten Antigens. Das Disialogangliosid GD₂ ist hierbei vielversprechend, da seine Expression in gesundem Gewebe weitgehend auf das zentrale Nervensystem und auf periphere Nerven beschränkt ist, während es in hohem Maß in diversen Tumorentitäten wie Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, SCLC (*Small cell lung cancer*) und BCSCs (*Breast cancer stem-like cells*) vorkommt. GD₂ trägt zu einer gesteigerten Proliferation von Tumorzellen und deren Metastasierung bei, so dass eine höhere Expression mit einem aggressiveren Phänotyp und einer schlechteren Prognose assoziiert ist [Nazha et al., 2020].

Viele Therapieansätze zur Behandlung GD₂-positiver Malignitäten basieren auf der passiven Immuntherapie mit GD₂-spezifischen Antikörpern. Trotz einiger ermutigender Resultate in präklinischen und frühen klinischen Studien zeigte deren Einsatz in Patienten jedoch nur begrenzten Erfolg. Dies war zum einen durch eine hohe Rezidivrate bedingt, zum anderen wurde kein Therapieeffekt bei fortgeschrittenen Tumoren festgestellt [Richards et al., 2018]. Die direkte Verbindung von Antikörper-basierter Immuntherapie und adoptivem Transfer von Immuneffektorzellen könnte hierbei von Vorteil sein, da die Kombination aus Tumorspezifität und zytotoxischer Effektorfunktion eine effizientere Antitumoraktivität ermöglicht. So stellen der Einsatz Antigen-spezifischer CAR-NK-Zellen oder eine Kombinationstherapie aus NK-Zellen und therapeutischen Antikörpern geeignete Ansätze zur Behandlung GD₂-positiver Tumoren dar. Neben primären Spender-NK-Zellen werden für die adoptive Immuntherapie als Alternative auch humane NK-Zelllinien wie NK-92 eingesetzt [Zhang et al., 2017]. In Vorarbeiten der Gruppe wurden bereits GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen generiert, die einen CAR der ersten Generation exprimierten und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine gesteigerte Antitumoraktivität gegen Neuroblastom-Zelllinien und primäre Tumorzellen aufwiesen [Esser et al., 2012; Seidel et al., 2015]. Um zudem die Proliferation und die Antitumoraktivität von Effektorzellen und *bystander* Immunzellen zu fördern, stellt der zusätzliche Einsatz immunstimulatorischer Moleküle einen vielversprechenden Ansatz dar [Melaiu et al., 2020].

Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit, weiter optimierte, NK-Zell-basierte Therapieansätze zur Behandlung GD₂-positiver Tumoren zu entwickeln. Diese umfassen zum einen CAR-NK-Zellen, abgeleitet durch die Transduktion von NK-92-Zellen mit einem Vektor kodierend für einen GD₂-spezifischen CAR der zweiten Generation. Weiterhin wurden NK-92-Zellen auch mit einem bicistronischen Vektor modifiziert, welcher neben dem GD₂-spezifischen CAR für den IL-15-Superagonisten RD-IL15 kodiert. Anschließend wurden die erhaltenen Zellen *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht. Zudem wurde der Einfluss des ektopisch exprimierten RD-IL15 auf die Effektivität der CAR-NK-92-Zellen selbst und seine immunstimulatorische Wirkung auf *bystander cells* in Abwesenheit exogener Stimuli analysiert. Als alternatives Therapiekonzept wurde darüber hinaus die Antitumoraktivität einer Kombination eines IgG1-basierten, GD₂-spezifischen scFv-Fc Fusionsproteins mit primären NK-Zellen *in vitro* untersucht.

5.1 Aktivität zielgerichteter NK-Zellen gegen GD₂-exprimierende Tumorzellen *in vitro*

5.1.1 GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen

Zur Generierung GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen wurde ein optimierter CAR der zweiten Generation entwickelt. Dieser enthält ein extrazelluläres scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von dem GD₂-spezifischen, humanisierten mAb hu14.18, das über eine flexible Gelenkregion des humanen CD8 α und der Transmembrandomäne des humanen CD28-Moleküls mit den intrazellulären Signaldomänen von CD28 und der CD3 ζ -Kette verbunden ist. Der resultierende CAR wurde als hu14.18.28.z bezeichnet (siehe Abb. 4.1, A und C). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Modifizierung von Effektorzellen mit CARs der zweiten Generation zu deren erhöhter Langlebigkeit und Antitumoraktivität führt [Maher et al., 2002; Imai et al., 2004; Savoldo et al., 2011; Imai et al., 2005]. Hierbei spielt auch die Art der ko-stimulatorischen Domäne eine entscheidende Rolle. So wurde bei einem direkten Vergleich GD₂-spezifischer CAR-NK-Zellen, deren CAR als ko-stimulatorische Domäne entweder 4-1BB oder CD28 enthielt, festgestellt, dass die 4-1BB-Domäne eine höhere Expression von TRAIL und FAS bewirkte als die CD28-Domäne. Da die Effektorzellen selbst TRAILR und FASL auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, förderte dies AICD (*Activation induced cell death*). Dies äußerte sich in einer niedrigeren Expansionsrate verglichen zu NK-Zellen mit CD28-enthaltendem CAR [Xu et al., 2019]. Für das in dieser Arbeit eingesetzte CAR-Konstrukt hu14.18.28.z wurde daher CD28 als ko-stimulatorische Domäne gewählt. Der CAR hu14.18.28.z wurde zusätzlich am C-Terminus über eine P2A-Sequenz an den IL-15-Superagonisten RD-IL15 fusioniert. Dieser ist ein Fusionsprotein, bestehend aus IL-15R α (Aminosäuren 31-107) und der IL-15-Mutante IL-15_{N72D} (siehe

Abb. 4.1, D). Bei der Transduktion von NK-92-Zellen mit den CAR-Konstrukten hu14.18.28.z und hu14.18.28.z_RD-IL15 zeigte sich eine eher geringe Transduktionseffizienz mit einem prozentualen Anteil eGFP-positiver NK-92-Zellen von lediglich 3,66 bis 4,48 % (siehe Abb. 4.2). Dies lässt sich durch die evolutionär bedingte hohe Resistenz von NK-Zellen gegenüber Virusinfektionen und damit der Aufnahme fremder Nukleinsäuren erklären [Lanier, 2008]. Diese kann partiell durch die Nutzung des Inhibitors BX795, welcher die TBK1/IKKε-induzierte Signalweiterleitung und somit die antivirale Immunantwort hemmt, unterdrückt werden [Sutlu et al., 2012]. Um eine homogene Zellpopulation von CAR-NK-92-Zellen zu erhalten, wurden erfolgreich modifizierte Zellen anhand des Markers eGFP, welcher über eine IRES-Sequenz mit dem CAR-Konstrukt verknüpft ist, mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung angereichert. Die Expression des CARs auf NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie und Immunoblot-Analyse untersucht. Hierbei wurde ein vergleichbares Expressionsniveau beider CARs festgestellt. Auf Proteinebene zeigte sich im Fall der RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen eine Bande mit einer molekularen Masse von etwas mehr als 84 kDa, die dem ungeschnittenen hu14.18.28.z_RD-IL15-Protein entspricht (siehe Abb. 4.3). In der Tat vermittelt die P2A-Sequenz keine 100 %-ige Prozessierung von Fusionsproteinen, wie Untersuchungen mit den Zelllinien HEK293T, HAT1080 und HeLa zeigten. Die Spaltungseffizienz war jedoch höher als die der 2A-Peptide T2A (Thosela asigna Virus 2A), F2A (*foot-and-mouth disease* Virus 2A) und E2A (*equine rhinitis A* Virus 2A) [Kim et al., 2011].

Um die Funktionalität und Spezifität der generierten GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro* Zytotoxizitätsassays mit Zielantigen-exprimierenden Zelllinien verschiedener Tumorentitäten durchgeführt. Als Zielzellen wurden die GD₂-positiven Tumorzelllinien SK-Mel-23 (Melanom), UKF-NB3 (Neuroblastom) und EL4 (Lymphom) sowie als Kontrollen die GD₂-negativen Tumorzelllinien K562 und MDA-MB453 eingesetzt (siehe Abb. 4.7, B). Um den Beitrag des GD₂-spezifischen CARs in An- und Abwesenheit des Zielantigens mit ansonsten isogenen Zielzellen bestimmen zu können, wurde zusätzlich die NK-Zell-resistente und GD₂-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB453 so modifiziert, dass die Glykosphingolipid-Struktur von GD₂ als Protein auf der Zelloberfläche nachgebildet wird. Hierzu wurde ein membranständiges Derivat des anti-idiotypischen Antikörpers Gangliomab (gTM) eingesetzt, welches mittels lentiviraler Transduktion in MDA-MB453-Zellen eingebracht wurde (MDA-MB453/gTM) (siehe Abb. 4.4, B und D). Gangliomab bildet das Epitop des Gangliosids GD₂ nach und wird daher von 14.18- und 14.G2A-basierten Antikörpern erkannt [Lode et al., 2013].

NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wiesen *in vitro* eine hohe und nahezu identische zielgerichtete Lyse von GD₂- oder Gangliomab-exprimierenden Tumorzellen auf. Die Resistenz von SK-Mel-23- und EL4-Zellen gegen die natürliche Zytotoxizität von parentalen NK-92-

Zellen wurde dabei durch die Expression der GD₂-spezifischen CARs überwunden, was sich in der effizienten Lyse durch NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen zeigte. Dies verdeutlicht, dass die CAR-vermittelte Zytotoxizität unabhängig von möglichen *Escape*-Mechanismen war und einer durch Tumorzellen vermittelten, vorwiegend inhibierenden Signalweiterleitung entgegenwirken kann. Gegenüber generell NK-sensitiven, aber GD₂-negativen Zielzellen blieb die natürliche Zytotoxizität der CAR-NK-92-Zellen erhalten, die eine mit der von parentalen NK-92 vergleichbar hohe Lyse von GD₂-negativen K562-Zellen aufwies. Ein additiver Effekt von natürlicher und CAR-vermittelter Zytotoxizität wurde bei der NK-Zell-sensitiven Neuroblastomzelllinie UKF-NB3 deutlich, welche zu einem signifikant höheren Anteil durch GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen lysiert wurde. Parentale MDA-MB453-Zellen waren erwartungsgemäß resistent gegenüber den getesteten NK-92- und CAR-NK-92-Zellen, während modifizierte MDA-MB453/gTM-Zellen mit hoher Effizienz von den GD₂-spezifischen NK-92-Zellen lysiert wurden (siehe Abb. 4.7, B). Diese Ergebnisse bestätigen die Abhängigkeit der CAR-Aktivität von der Expression des Zielantigens. Um den Beitrag der spezifischen CAR-Aktivierung zur Lyse GD₂-positiver Zielzellen weiter zu verdeutlichen, wurden in parallelen Ansätzen Ko-Kulturen in Anwesenheit eines von Ganglidiomab abgeleiteten kompetitiven Antikörpers angesetzt. Dieser setzt sich aus einem scFv-Fragment von Ganglidiomab und einer IgG4-Fc-Domäne zusammen. Durch die Bindung an GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen blockiert das Ganglidiomab-Fc-Molekül die Bindung des CARs an GD₂. Zunächst wurde die spezifische Bindung des rekombinanten Antikörpers an NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestätigt (siehe Abb. 4.6). In nachfolgenden Zytotoxizitätsassays führte die Zugabe des 14.18-spezifischen Kompetitors Ganglidiomab-Fc wie erwartet zu einer Abnahme der Antitumoraktivität der GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen gegenüber Zielantigen-exprimierenden Tumorzellen auf das Niveau der natürlichen Zytotoxizität parentaler NK-92-Zellen (siehe Abb. 4.7, B). Dies unterstreicht den entscheidenden Beitrag der CAR-Konstrukte zur Selektivität und Effektivität der Tumorzellyse durch NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen.

5.1.2 Kombination eines GD₂-spezifischen Miniantikörpers mit CD16-positiven NK-Zellen

Der zweite Ansatz, der in dieser Arbeit verfolgt wurde, umfasst den GD₂-spezifischen Miniantikörper hu14.18-Fc, welcher sich aus dem scFv(hu14.18)-Fragment und einer ADCC auslösenden IgG1-Fc-Domäne zusammensetzt. Hu14.18-Fc ist in der Lage, spezifisch an GD₂-exprimierende humane und murine Tumorzellen zu binden (siehe Abb. 4.24). In Zytotoxizitätsassays zeigte sich zudem nach Zugabe des Miniantikörpers eine signifikant gesteigerte Antitumoraktivität CD16-positiver, primärer NK-Zellen gegenüber GD₂-positiven EL4-Zellen von etwa 36 % auf 60 % spezifischer Lyse (E:T = 10:1), welche bei geringeren E:T-Verhältnissen beibehalten wurde (siehe Abb. 4.25, C). Der ErbB2-spezifische, IgG1-basierte Antikörper Trastuzumab, welcher als Kontrolle diente, hatte hingegen

keinen Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen. Dies verdeutlicht die Abhängigkeit der ADCC-induzierten Lyse von der Expression des Zielantigens.

Dennoch waren die in dieser Arbeit generierten GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen der Kombination aus dem Antikörper hu14.18-Fc und CD16-positiven NK-Zellen überlegen und stellen daher einen wahrscheinlich effektiveren Therapieansatz dar. So belief sich die Lyse von EL4-Zellen durch NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 auf etwa 74 % (siehe Abb. 4.7, B). Eine höhere Wirksamkeit von CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zu ADCC-induzierenden Antikörpern wurde auch in einer vergleichenden *in vitro* Studie nachgewiesen. Hierbei bewirkten CD20-spezifische CAR-NK-92-Zellen eine höhere Lyse primärer CLL (*Chronic lymphocytic leukemia*)-Zellen als eine Kombination aus CD16-exprimierenden NK-92-Zellen und einem CD20-spezifischen Antikörper [Boissel et al., 2013].

Ein auf dem GD₂-spezifischen Antikörper hu14.18 basierendes Immunzytokin (hu14.18-IL2) wurde bereits in klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit GM-CSF und Isotretinoin zur Behandlung diverser Tumorentitäten wie Neuroblastom und Melanom eingesetzt. Diese Therapieansätze waren erfolgreich in der Behandlung minimaler Resterkrankungen, hatten jedoch keine Wirkung bei fortgeschrittenen Tumoren [Albertini et al., 2012; Shusterman et al., 2019]. In vergleichenden präklinischen Analysen der Immunzytokine hu14.18-IL2 und hu14.18-IL15 wurden immunkompetente Mäuse 8 Tage nach orthotoper Injektion muriner Neuroblastom-Zellen in die Nebenniere täglich für 5 Tage mittels intravenöser Applikation des jeweiligen Fusionsproteins behandelt. Hierbei wiesen Mäuse, welche hu14.18-IL15 erhielten, eine im Vergleich zu der Gruppe, welche mit hu14.18-IL2 behandelt wurde, geringere Tumorlast beziehungsweise ein verlängertes Überleben auf. Gründe hierfür waren unter anderem die erhöhte Aktivierung CD8-positiver T-Zellen sowie die Hemmung immunsupprimierender Zellen nach der Therapie mit hu14.18-IL15 [Nguyen et al., 2022].

Eine mögliche Strategie, um die Effektivität des in dieser Arbeit generierten hu14.18-Fc-Antikörpers weiter zu erhöhen, stellt somit die Fusionierung an ein Zytokin wie IL-15 oder RD-IL15 dar. Eine derartige Modifikation könnte die antitumorale Aktivität ADCC-induzierender Immunzellen gegenüber GD₂-exprimierenden Tumorzellen weiter fördern.

5.2 Immunmodulation durch ektopische Expression von RD-IL15

5.2.1 IL-15 in der Krebsimmuntherapie

IL-15 gehört neben den Zytokinen IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21 der *Common γ chain* (γ c) Familie an [Lin und Leonard, 2018]. IL-2 wurde zuerst entdeckt und dabei als T-Zell-Wachstumsfaktor

identifiziert [Morgan et al., 1976]. Es ist auch das erste von der FDA für die Immuntherapie zugelassene Zytokin (Proleukin®) und wurde zunächst für die Behandlung von metastasierendem Nierenzellkarzinom und Melanom eingesetzt [Fyfe et al., 1995; Rosenberg et al., 1994]. In Langzeitstudien zeigten 7 % beziehungsweise 6 % der behandelten Patienten eine vollständige Remission [Atkins et al., 1999; Fisher et al., 2000]. Die systemische Behandlung mit IL-2 ist jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie dem Kapillarlecksyndrom verbunden [Schwartz et al., 2002]. Des Weiteren trägt IL-2 zum aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) und der Stimulierung immunsuppressiver Tregs bei [Lenardo, 1991; Nelson, 2004]. Daher wurden neben IL-2 auch weitere Zytokine der γ -Familie auf ihren Nutzen für die Immuntherapie untersucht. Laut *U.S. National Cancer Institute*, welches eine Liste von Therapeutika mit hohem Potenzial zur Nutzung in der Krebsimmuntherapie erstellte, wird IL-15 von 124 vorgeschlagenen Wirkstoffen die höchste Effizienz beigemessen [Cheever, 2008]. IL-15 weist aufgrund der gemeinsamen IL-2/IL-15 β - und γ -Ketten strukturelle und funktionale Überschneidungen mit IL-2 auf. So reguliert es unter anderem die Proliferation aktivierter T-Zellen und trägt entscheidend sowohl zur Aktivierung als auch zum Überleben von NK-Zellen bei [Budagian et al., 2006]. Jedoch gibt es auch deutliche Unterschiede zu IL-2, welche IL-15 zu einem vielversprechenden Wirkstoff in der Krebsimmuntherapie machen. Neben der Hemmung von IL-2 induziertem AICD hat IL-15 nur einen marginalen Effekt auf die Aktivierung von Tregs. Zudem führt die Stimulierung mit IL-15 zur Erhaltung CD8-positiver T-Gedächtniszellen [Waldmann et al., 2011; Zhou et al., 2022].

In der ersten Phase I-Studie zur Untersuchung der Sicherheit bewirkte die systemische Injektion von hulIL-15 bei Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom oder Melanom keine schweren Nebenwirkungen. Beobachtete Effekte wie Fieber oder Hypotonie wurden auf eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IFN γ zurückgeführt. Es zeigte sich auch eine Steigerung der Zahl an NK-Zellen und CD8-positiven T-Gedächtniszellen, und nur eine geringe Proliferation von Tregs [Conlon et al., 2015].

IL-7, welches laut *U.S. National Cancer Institute* auf Platz 5 vielversprechender Therapeutika steht, ist unter anderem essentiell für die Entwicklung und Erhaltung von T-Zellen [Cheever, 2008]. In Phase I und II Studien zeigte sich dieser Effekt in einer deutlichen Expansion CD4- und CD8-positiver T-Zellen. Die stimulatorische Wirkung auf die NK-Zellpopulation war jedoch nur gering [Kim et al., 2021]. In *in vitro* Studien führte die Zugabe von IL-7 nicht zur Aktivierung der Effektorfunktionen primärer NK-Zellen, sondern stimulierte lediglich CD56^{bright}-Zellen, welche von einer geringen Zytotoxizität geprägt sind [Michaud et al., 2010]. Letztendlich stellt IL-15 sowohl aufgrund seiner Bedeutung in der Entwicklung von NK-Zellen und deren Homöostase als auch aufgrund der Vorteile gegenüber anderen Zytokinen der γ -Familie das bevorzugte Zytokin für den Einsatz bei NK-Zell-basierten Immuntherapien dar.

5.2.2 Eigenschaften des IL-15-Superagonisten RD-IL15

Rekombinantes IL-15 hat eine relativ kurze *in vivo* Halbwertszeit mit weniger als 1 h in Mäusen und zwischen 2,5 und 12 h in Menschen, was seine Effektivität in der Immuntherapie beschränkt. Die Biostabilität von IL-15 ist dabei abhängig von der Verfügbarkeit der Rezeptoruntereinheit IL-15R α [Knudson et al., 2020]. Die Bindung von IL-15 an IL-15R α erfolgt bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) der produzierenden Zellen und führt zum effizienten Transfer des Komplexes vom ER durch das Zytoplasma an die Zelloberfläche. Hierbei wird der IL-15/IL-15R α -Komplex in membrangebundener Form (mbIL-15/IL-15R α) oder nach Abspaltung in löslicher Form (sIL-15/IL-15R α) präsentiert [Bergamaschi et al., 2012]. Die Signalweiterleitung erfordert die Bindung des IL-15/IL-15R α -Dimers an den *Intermediate affinity*-Rezeptor IL-15R β/γ c der produzierenden Zellen selbst (autokrin) oder umgebender Zellen (parakrin). IL-15, welches nicht intrazellulär mit der IL-15R α -Kette interagiert, wird ausschließlich in geringen Mengen sekretiert und weist eine geringere Stabilität beziehungsweise Bioaktivität auf (*soluble* IL-15, sIL-15) [Bergamaschi et al., 2008].

Um diesen Hindernissen entgegenzuwirken, wurden für Immuntherapien IL-15/IL-15R α -Fusionsproteine entwickelt. Diese werden als IL-15-Superagonisten bezeichnet, da sie aufgrund ihrer Struktur eine gesteigerte Wirksamkeit und Stabilität *in vivo* aufweisen [Knudson et al., 2020]. Der IL-15-Superagonist N-803, welcher aus der Zytokin-bindenden Sushi-Domäne des IL-15R α (IL-15R α_{31-107}) und der IL-15-Mutante IL-15_{N72D}, fusioniert mit einer IgG1-Fc Domäne, besteht, wurde im Serum von Patienten noch 7 Tage nach subkutaner Injektion nachgewiesen [Romee et al., 2018].

Das in dieser Arbeit eingesetzte Zytokin RD-IL15 stellt eine lösliche Form des IL-15/IL-15R α -Komplexes dar, bestehend aus der Sushi-Domäne des IL-15R α (IL-15R α_{31-107}) und IL-15_{N72D}. Nach Sekretion bindet dieses an den *Intermediate affinity*-Rezeptor der Produzentenzelle oder benachbarter Immunzellen. Die Sekretion von RD-IL15 und seine anschließende Bindung an NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse unter Zuhilfenahme eines huIL-15-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (siehe Abb. 4.9, B). Die stimulatorische Wirkung von RD-IL15 wurde dann durch den Nachweis der Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs mittels Immunoblot bestätigt. Ähnlich wie IL-2 führt die Bindung von IL-15 an den *Intermediate affinity*-Rezeptor zur Aktivierung der Kinasen JAK1 und JAK3, welche daraufhin unter anderem den Transkriptionsfaktor STAT5 phosphorylieren [Johnston et al., 1995]. Phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) weist somit die Funktionalität von RD-IL15 nach. Während in der Immunoblot-Analyse von parentalen NK-92-Zellen in Abwesenheit von IL-2 nur eine schwache Bande von pSTAT5 gefunden wurde, zeigte sich ein starkes Signal bei RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen (siehe Abb. 4.10, B). Dies belegt die Kompensierung des IL-2-Defizits durch sekretiertes RD-IL15 in NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen.

5.2.3 Umgehung unerwünschter Nebeneffekte von IL-15 durch die ektopische Expression von RD-IL15

Aufgrund der aktivierenden Wirkung von IL-15 insbesondere auf NK-Zellen wurden in dieser Arbeit zur Steigerung der Antitumor-Reaktivität CAR-NK-92-Zellen generiert, die zusätzlich den IL-15-Superagonisten RD-IL15 sekretierten. Neben den bekannten positiven immunstimulatorischen Wirkmechanismen von IL-15 ist dessen erhöhte Expression jedoch in diversen Erkrankungen auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert [Fehniger und Caligiuri, 2001]. Dies zeigt sich beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), welche durch eine IL-15 bedingte anomale T-Zell-Infiltration und Aktivierung initiiert werden könnte [McInnes et al., 1996]. Einen möglichen Ansatz zur Behandlung von RA-Patienten stellt daher der Einsatz IL-15-spezifischer Antagonisten wie löslichem IL-15R α oder IL-15-spezifischer Antikörper dar [Ruchatz et al., 1998; Baslund et al., 2005]. IL-15 erwies sich auch in einigen Studien als tumorfördernd. Eine Überexpression von IL-15 beziehungsweise IL-15R α wurde sowohl in hämatologischen als auch soliden Tumoren nachgewiesen. So zeigte sich in hämatologischen Neoplasien wie dem kutanen T-Zell-Lymphom oder multiplen Myelom eine erhöhte Expression von IL-15 und IL-15R α in CD4-positiven T-Zellen beziehungsweise malignen Plasmazellen. Dies ermöglichte deren autokrine Stimulierung und Proliferation unabhängig vom Tumormikromilieu [Döbbeling et al., 1998; Tinhofer et al., 2000]. Transgene Mäuse, welche murines IL-15 überexprimierten (IL-15tg-Mäuse), entwickelten in der frühen Phase eine gutartige Lymphozytose, bestehend aus NK-Zellen und CD8-positiven Gedächtniszellen. Nach mehreren Monaten führte die dauerhafte IL-15-Sekretion jedoch in einem Großteil der Mäuse zu einer lymphatischen Leukämie [Fehniger et al., 2001]. Auch in soliden Tumoren wie dem metastasierenden Melanom wird eine positive Korrelation zwischen der Expression von IL-15 und der Tumorprogression vermutet. In Mausmodellen führte die Zugabe von 50 ng huIL-15 zu einem aggressiveren Wachstum injizierter humaner Melanomzellen [Doucet et al., 1997] und die Untersuchung der Seren von Melanom-Patienten ergab eine erhöhte Menge von sIL-15/IL-15R α [Bergamaschi et al., 2012]. Beim therapeutischen Einsatz von IL-15 zeigte sich zudem, dass die Dauer der Stimulierung entscheidend für potenzielle negative Nebeneffekte ist. So kann eine kontinuierliche systemische Verabreichung des IL-15-Superagonisten N-803 in Kombination mit allogener NK-Zell Transplantation zu einer Aktivierung CD8-positiver Empfänger-T-Zellen führen, die wiederum eine Abstoßung der Spender-NK-Zellen auslösen können [Berrien-Elliott et al., 2022].

Ähnliches zeigte sich auch in immunkompetenten Mausmodellen, bei denen die kontinuierliche IL-15-Gabe eine eingeschränkte Proliferation von NK-Zellen bedingte, die jedoch durch Depletion CD8-positiver T-Zellen behoben werden konnte. In T-Zell-depletierten immundefizienten Mäusen wurde hingegen das Wachstum von NK-Zellen nach chronischer IL-15-Stimulierung von Anfang an aufrecht

erhalten [Frutoso et al., 2018]. Die Analyse der NK-Zellen immunkompetenter Mäuse nach lang anhaltender Gabe von IL-15 oder einem IL-15-Superagonisten ergab, dass sie im Vergleich zu einer transienten Stimulierung einen verminderten Aktivierungszustand aufwiesen. Dies äußerte sich in einer reduzierten STAT5-Phosphorylierung, der Herunterregulierung von Aktivierungsmarkern wie NKG2D, NKp46, IFN γ und CD3 ζ beziehungsweise der Hochregulierung inhibierender Rezeptoren wie NKG2A [Frutoso et al., 2018; Elpek et al., 2010]. Zudem zeigte sich eine verminderte Antitumoraktivität von NK-Zellen nach chronischer Stimulierung. Eine negative Wirkung auf CD8-positive Zellen konnte hingegen nicht festgestellt werden [Elpek et al., 2010]. Doch nicht nur die Dauer, sondern auch die Art der Verabreichung ist entscheidend. In einer Phase I Studie zur Behandlung von rezidivierender oder refraktärer AML wurde hIL-15 in Kombination mit haploidentischen NK-Zellen entweder subkutan oder intravenös verabreicht. Die subkutane Injektion nach Lymphodepletion führte bei knapp 60 % der Patienten zu einem CRS (*Cytokine release syndrome*), während die intravenöse Verabreichung keine Toxizitäten hervorrief. Ein möglicher Grund hierfür ist die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Gewebsmakrophagen, welche von T-Zellen stimuliert werden [Cooley et al., 2019].

Eine einmalige, nicht jedoch eine lang anhaltende Gabe von IL-15 scheint sich daher positiv auf den Therapieerfolg auszuwirken. Die chronische Stimulierung könnte NK-Zellen in einen Zustand versetzen, welcher vergleichbar mit dem NK-Zell-Phänotyp des späten Differenzierungsstadiums ist und sich in einer verringerten Proliferation und Aktivierung äußert [Elpek et al., 2010]. Eine derartige Auswirkung auf die in dieser Arbeit generierten RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen wurde jedoch nicht festgestellt, was im Folgenden näher erläutert wird.

So sind negative Effekte, welche mit einer kontinuierlichen IL-15-Stimulierung von *bystander* Zellen einhergehen können, bei den in dieser Arbeit generierten RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen kaum zu erwarten, da der IL-15-Superagonist hauptsächlich in autokriner Weise wirkt. Unsortierte NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen waren in der Lage, sich in einer heterogenen Zellpopulation aus parentalen und RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen anzureichern, welche 3 Tage nach Transduktion in IL-2-freies Kulturmedium transferiert wurde (siehe Abb. 4.12). Ab Tag 48 erlangten modifizierte CAR-NK-92-Zellen ein Plateau von etwa 85 %, was darauf hindeutet, dass der sekretierte IL-15-Superagonist hauptsächlich autokrin wirkt und erst ab diesem Zeitpunkt im Medium eine ausreichende Menge an RD-IL15 für die parakrine Stimulierung unmodifizierter Zellen zur Verfügung steht. Eine zu hohe Sekretion wird somit vermieden, was möglichen Nebenwirkungen aufgrund einer übermäßigen Aktivierung umgebender Immunzellen entgegenwirkt. Zudem ist die Zytokin-Sekretion durch CAR-NK-92-Zellen im Vergleich zur systemischen Gabe lokal begrenzt, wodurch ungewollte Effekte durch Überstimulierung reduziert werden können. Mögliche systemische Nebenwirkungen, welche dennoch bei der Verwendung RD-IL15-sekretierender CAR-NK-92-Zellen auftreten könnten,

könnten durch entsprechende Sicherheitsmaßnahmen begrenzt werden. NK-92-Zellen werden in klinischen Studien vor ihrer Verabreichung zur Vermeidung der Bildung eines sekundären Lymphoms mit 10 Gy bestrahlt [Tonn et al., 2001; Tonn et al., 2013]. In einer Studie unserer Gruppe nahm die Anzahl lebensfähiger NK-92/5.28.z CAR-NK-Zellen nach einer Bestrahlung mit 10 Gy schrittweise ab, so dass diese ab Tag 5 nicht mehr nachweisbar waren [Schönfeld et al., 2015]. Um einen möglichen Effekt des IL-15-Superagonisten auf die Strahlensensitivität modifizierter CAR-NK-92-Zellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Proliferationsassays durchgeführt, in welchen die Expansionsrate sowohl parentaler als auch CAR-NK-92-Zellen ohne beziehungsweise mit ektopischer RD-IL15-Expression nach einer Bestrahlung mit 10 Gy untersucht wurde (siehe Abb. 4.13). Dabei wurde kein Unterschied in der Proliferation der getesteten Zelllinien festgestellt, so dass ein möglicher Effekt von RD-IL15 auf die Langlebigkeit bestrahlter NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Die autokrine Stimulierung von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen durch RD-IL15 konnte in funktionalen Assays bestätigt werden. Proliferation und Zytotoxizität von primären NK-Zellen und NK-92-Zellen sind abhängig von exogenem IL-2. Im Fall von NK-92-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese nach IL-2-Depletion innerhalb von 72 h absterben [Gong et al., 1994]. Die Fähigkeit von NK-92-Zellen, das IL-2-Defizit durch die ektopische Expression von IL-15 zu kompensieren, wurde in einer vorangegangenen Arbeit verdeutlicht. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass NK-92-Zellen in der Lage waren, nach genetischer Modifizierung mit humanem IL-15 in IL-2-freiem Kulturmedium zu proliferieren und ihre Zytotoxizität aufrecht zu erhalten, während parentale NK-92-Zellen ihr Wachstum einstellten [Sahm et al., 2012]. Die Immunoblot-Analyse von pSTAT5 bestätigte, dass auch der hier eingesetzte IL-15-Superagonist in der Lage ist, eine fehlende IL-2-Stimulierung zu kompensieren (siehe Abb. 4.10). Darüber hinaus wiesen RD-IL15-sekretierende CAR-NK-92-Zellen in IL-2-haltigem Kultivierungsmedium eine höhere Wachstumsrate als parentale NK-92- und CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 auf (siehe Abb. 4.11). Die Kultivierung in IL-2-freiem Medium führte bei NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen nach 24 h zu einer raschen Abnahme der Proliferationsrate, wohingegen das Wachstum von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nicht signifikant beeinflusst wurde. Deren etwas geringere Zelldichte nach IL-2-Entzug war vergleichbar mit der von parentalen NK-92- und CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 in Anwesenheit von exogenem IL-2. Dies verdeutlicht, dass ektopisch exprimiertes RD-IL15 in der Lage ist, das IL-2-Defizit auszugleichen und hierdurch das Überleben der Produzentenzellen aufrecht zu erhalten. Die autokrine Aktivierung durch RD-IL15 zeigte sich auch in Zytotoxizitätsassays, in welchen entweder parentale NK-92-Zellen oder RD-IL15-exprimierende CAR-NK-92-Zellen mit der NK-Zell-sensitiven Tumorzelllinie K562 oder der GD₂-positiven Melanomzelllinie SK-Mel-23 in An- oder Abwesenheit von IL-2 ko-kultiviert wurden (siehe Abb. 4.14). Sowohl die natürliche als auch die CAR-vermittelte Antitumoraktivität modifizierter CAR-

NK-92-Zellen blieb in IL-2-freiem Medium erhalten. Während die CAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber SK-Mel-23-Zellen unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst wurde, wurde ein nur leichter Rückgang der natürlichen Zytotoxizität von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen beobachtet. Dies lässt sich durch die zunächst etwas reduzierte Vitalität dieser Zellen direkt nach IL-2-Entzug erklären (siehe Abb. 4.11). Nach wenigen Tagen ohne IL-2 stabilisierte sich diese jedoch wieder.

NK-Zellen können durch eine andauernde IL-15-Stimulierung in einen anergischen Zustand geraten, welcher sich in einer verminderten Aktivierung und Hyporesponsivität äußert [Elpek et al., 2010; Felices et al., 2018]. Dies wurde jedoch bei RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen, welche für längere Zeit kultiviert wurden, nicht beobachtet. Zum einen war die Signalweiterleitung in RD-IL15-exprimierenden NK-92-Zellen nicht eingeschränkt, was durch ein gleichbleibend starkes pSTAT5-Signal nach IL-2-Depletion verdeutlicht wurde (siehe Abb. 4.10). Zum anderen wiesen NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen dauerhaft eine vergleichbare natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität wie NK-92/hu14.18.28.z-Zellen auf (siehe Abb. 4.7, B), welche auch nach IL-2-Depletion erhalten blieb (siehe Abb. 4.14). Weiterhin wurde die Expression aktivierender und inhibitorischer Oberflächenmarker sowohl im nicht aktivierten Zustand als auch nach repetitiver Stimulierung mit den Zielzellen K562 und EL4 analysiert (siehe Abb. 4.15). Dabei zeigte sich im Gegensatz zu parentalen NK-92-Zellen und CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 bei NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen im Allgemeinen eine erhöhte Expression des aktivierenden Markers NKp30 und eine Reduzierung der inhibitorischen Marker NKG2A und TIM-3. Eine Herunterregulierung von NKp30 nach Stimulierung wurde bei RD-IL15-exprimierenden NK-92-Zellen im Vergleich zu den anderen Effektorzellgruppen nicht beobachtet. Ebenso wies der inhibitorische Marker PD-1 eine stabile Oberflächenexpression auf, während NK-92- und NK-92/hu14.18.28.z-Zellen diesen nach wiederholter Stimulierung mit K562-Zellen heraufregulierten. RD-IL15 beeinflusst den Aktivierungszustand der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen somit nicht negativ, sondern wirkt vielmehr einem anergischen Zustand entgegen. Dies ist mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar, in welchen IL-15-sekretierende, GD₂-spezifische CAR-Effektorzellen zur Behandlung des Neuroblastom eingesetzt wurden. *In vitro* Analysen IL-15-exprimierender CAR-T- beziehungsweise NKT-Zellen ergaben eine Herunterregulierung inhibitorischer Marker wie PD-1 und LAG-3 [Xu et al., 2019; Chen et al., 2019]. Da Neuroblastom-Zellen PD-L1 exprimieren können, könnte eine gehemmte Hochregulierung von PD-1 durch die ektopische Expression des IL-15-Superagonisten einer Immunsuppression entgegenwirken und die Antitumoraktivität aufrechterhalten [Chen et al., 2019].

5.2.4 RD-IL15-vermittelte parakrine Stimulation umgebender Immunzellen

In einer vorangegangenen Arbeit unserer Gruppe wurden IL-15-exprimierende NK-92-Zellen generiert [Sahm et al., 2012]. Nach Selbstanreicherung in IL-2-freiem Medium lag deren Anteil bei nahezu 100 %. Diese Zellen sekretierten nur eine geringe Menge an IL-15 in den Kulturüberstand (<70 pg/ml; 2×10^5 Zellen/ml; 72 h), was nicht ausreichte, um das Wachstum der IL-2-/IL-15-abhängigen murinen T-Zelllinie CTLL-2 zu stimulieren. Im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Selbstanreicherungsexperiments in IL-2-defizientem Kultivierungsmedium konnte dagegen keine vollständig homogene Population RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen generiert werden (siehe Abb. 4.12). Dies wies bereits darauf hin, dass eine ausreichende Menge an IL-15-Superagonist sekretiert wurde, um nicht transduzierte *bystander* Zellen parakrin zu stimulieren. Zur Überprüfung wurden CTLL-2-Zellen in IL-2-freies, konditioniertes Medium RD-IL15-exprimierender CAR-NK-92-Zellen transferiert und für 7 Tage kultiviert (siehe Abb 4.17). In Kontrollansätzen wurde das Kulturmedium der CTLL-2-Zellen mit 50 IU/ml IL-2 oder unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem huIL-15 versetzt. Parallel wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Mit konditioniertem Medium der RD-IL15-exprimierenden NK-92-Zellen wurde dabei gegenüber dem unstimulierten Kontrollansatz nach 7 Tagen eine signifikant gesteigerte Proliferation der CTLL-2-Zellen beobachtet. Jedoch führte die Zugabe rekombinanter Zytokine zu einer noch höheren Proliferation der CTLL-2-Population. Eine mögliche Erklärung könnte hierbei eine geringere Konzentration des sekretierten RD-IL15 im Vergleich zu den Ansätzen mit rekombinantem huIL-15 darstellen. Dies konnte im ELISA jedoch nicht bestätigt werden (etwa 36 ng/ml; 1×10^6 Zellen/ml; 72 h) (siehe Abb. 4.16). Eine andere Ursache könnte ein verringerter Nährstoffgehalt des konditionierten Mediums darstellen. Dies könnte das Wachstum der CTLL-2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen, welche in frischem Kulturmedium angesetzt wurden, hemmen. Insgesamt bestätigt dieses Experiment jedoch, dass biologisch aktiver IL-15-Superagonist in den Überstand abgegeben wird und auf *bystander* Zellen wirkt.

In nachfolgenden Transwell-Experimenten wurde nachgewiesen, dass sekretiertes RD-IL15 auch in der Lage ist, primäre humane Lymphozyten zu stimulieren. Für diese Versuche wurden NK-92-Zellen und primäre Immunzellen mit Transwell-Einsätzen räumlich getrennt, welche den Transfer von Zytokinen, nicht aber von Zellen ermöglichen. So können mögliche stimulierende Effekte auf RD-IL15 zurückgeführt werden. Für einen Transwell-Zytotoxizitätsassay wurden PBMCs eines gesunden Spenders mit in Transwell-Einsätzen ausgesäten RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen für 16 h ko-kultiviert (siehe Abb. 4.18). Am nächsten Tag wurde die NK-Zell-sensitive Zelllinie K562 als Zielzelllinie zu den PBMCs gegeben. Als Kontrolle dienten PBMCs, welche unstimuliert blieben oder mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen kultiviert wurden. Zur Überprüfung des stimulierenden Effekts einer

definierten Konzentration von IL-15 wurden als Positivkontrolle PBMCs mitgeführt, welche mit 20 ng/ml huIL-15 stimuliert wurden. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen über das sezernierte RD-IL15 in der Tat die Antitumoraktivität von PBMCs gegenüber K562-Zellen erhöhen, während CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 keinen Effekt auf die Tumorzelllyse hatten.

Ebenfalls konnte die stimulatorische Wirkung des IL-15-Superagonisten auf die Proliferation von NK-Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden in einem weiteren Transwell-Experiment primäre NK-Zellen mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen für 7 Tage ko-kultiviert (siehe Abb. 4.19). Entsprechende Kontrollen wurden wie im vorherigen Experiment mitgeführt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Proliferationsrate der primären NK-Zellen nach Stimulation mit NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle oder nach Ko-Kultivierung mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen. Hierbei war der prozentuale Anteil der CD3⁺CD56^{bright}-Zellen höher als der der CD3⁺CD56^{dim}-Zellen. Klassischerweise gelten CD56^{bright}-NK-Zellen als immunregulatorische Subpopulation, während CD56^{dim}-NK-Zellen entscheidend für die Antitumoraktivität sind [Cooper et al., 2001]. In Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die transiente Stimulierung mit IL-15 oder dem IL-15-Superagonisten N-803 die Effektorfunktion von CD56^{bright}-NK-Zellen deutlich steigert. Diese wiesen eine erhöhte Degranulierung, Zytokinproduktion (IFN γ , TNF) und Zytotoxizität sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* auf [Wagner et al., 2017]. Entsprechend könnten auch die bei Ko-Kultur durch Stimulierung mit dem IL-15-Superagonisten RD-IL15 generierten CD3⁺CD56^{bright}-NK-Zellen wirksame Effektorzellen mit erhöhter Antitumoraktivität sein.

In einer Transwell-basierten, gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) wurde zudem nachgewiesen, dass sich sekretiertes RD-IL15 auch auf das Wachstum CD8-positiver T-Zellen auswirkt (siehe Abb. 4.20). Hierfür wurden PBMCs eines Spenders mit CD3-negativen, bestrahlten PBMCs eines zweiten Spenders, welche als Stimulatorzellen dienten, vermischt. Anschließend wurden die Ansätze mit in Transwells ausgesäten NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen für 7 Tage ko-inkubiert. In Kontrollansätzen wurden unstimulierte PBMCs, PBMCs mit CAR-NK-92-Zellen ohne RD-IL15 oder PBMCs zusammen mit rekombinantem huIL-15 kultiviert. Des Weiteren wurden parallele Ansätze ohne Stimulatorzellen angesetzt. Unstimulierte und mit NK-92/hu14.18.28.z-Zellen versetzte PBMCs proliferierten kaum. Nach Stimulierung mit RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen erhöhte sich deren Wachstum dagegen signifikant. Ebenso wurde die durch Stimulatorzellen induzierte erhöhte Proliferationsrate von CD8-positiven Zellen durch Ko-Kultivierung mit NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen weiter verstärkt.

Der bereits beschriebene stimulatorische Effekt von IL-15 auf die Erhaltung CD8-positiver T-Gedächtniszellen konnte in diesen Versuchen durch sekretiertes RD-IL15 nicht erreicht werden

[Waldmann et al., 2011]. Hierzu wurden PBMCs wie im vorherigen Experiment beschrieben mit RD-IL15-exprimierenden CAR-NK-92-Zellen ko-kultiviert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von T-Gedächtniszellen innerhalb der CD8-positiven Population bestimmt, wobei zwischen T_{N^-} (naiv), T_{CM^-} (Central memory), T_{EM^-} (Effector memory) und T_{EFF} (Effektor)-Zellen unterschieden wurde (siehe Abb. 4.21). Während exogenes hUL-15 in der Tat das Wachstum von T_{CM^-} und T_{EM^-} -Zellen förderte, potenziert durch die Zugabe von Stimulatorzellen, hatten NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nur einen sehr geringfügigen Effekt auf die T_{EM^-} -Population. Vielmehr wurde ein erhöhter Anteil von T_{EFF} -Zellen nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu Studien, welche den Einfluss von IL-15 auf den Phänotyp von T-Zellen ermittelten. Dabei führte eine konstante Stimulierung von CAR-T-Zellen mit IL-15 vorwiegend zu einem T_{SCM} (Stem cell memory)-Phänotyp [Alizadeh et al., 2019]. Zudem wiesen IL-15-sekretierende, GD₂-spezifische CAR-T-Zellen einen Phänotyp auf, welcher T_{CM^-} und T_{SCM} -Zellen entspricht [Chen et al., 2019]. IL-15 spielt eine bedeutende Rolle in der Expansion sowohl von T-Effektor- als auch von T-Gedächtniszellen, welche eine erhöhte Expression von IL-15R α aufweisen [Rochman et al., 2009]. Es wurde gezeigt, dass die IL-15-Stimulierung das Überleben CD8-positiver T-Effektorzellen während der klonalen Kontraktion sichert und somit deren Differenzierung in T-Gedächtniszellen ermöglicht [Yajima et al., 2006].

Grundsätzlich bestätigten die Ergebnisse der Transwell-Assays jedoch, dass die Menge an sekretiertem RD-IL15 ausreicht, um sowohl das Wachstum von NK- und CD8-positiven T-Zellen als auch die Antitumoraktivität von NK-Zellen zu stimulieren. Sowohl in Proliferations- als auch in Zytotoxizitätsassays war der Effekt jedoch geringer ausgeprägt als in den jeweiligen Vergleichsansätzen mit rekombinantem hUL-15. Eine niedrigere Konzentration von sekretiertem RD-IL15 als die des für die Transwell-Experimente eingesetzten hUL-15 konnte mit einem ELISA ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4.16). Mögliche Erklärungen stellen dagegen die reduzierte Menge an Nährstoffen im konditionierten Medium und der zusätzliche Nährstoffverbrauch durch ko-kultivierte CAR-NK-92-Zellen dar. Des Weiteren könnte die Sekretion weiterer immunmodulatorischer Proteine durch CAR-NK-92-Zellen dem stimulatorischen Effekt des sekretierten RD-IL15 entgegenwirken. In unserer Gruppe wurde in Überständen RD-IL15-exprimierender NK-92-Zellen eine erhöhte Menge an sekretiertem IL-10 festgestellt (Bhatti et al., unveröffentlicht). IL-10 stellt ein pleiotropes Zytokin dar, welches sowohl eine immunsupprimierende als auch -stimulierende Wirkung auf eine Vielzahl von Immunzellen ausüben kann. So fördert IL-10 einerseits die Proliferation von aktivierten CD8-positiven T-Zellen, während es andererseits auch eine hemmende Wirkung auf die CD8-positive Zellpopulation haben kann [Groux et al., 1998; Smith et al., 2018]. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass die Sekretion immunstimulatorischer Moleküle allein für eine effektive Immunmodulation nicht ausreichend sein könnte, sondern Zell-Zell-Kontakte einen entscheidenden zusätzlichen Beitrag liefern. So führen zum Beispiel Interaktionen zwischen

NK- und T-Zellen über den Rezeptor 2B4 und den Liganden CD48 zu einer gesteigerten Effektorfunktion und Proliferation der T-Zellen [Assarsson et al., 2004]. Dies wird jedoch im Rahmen der Transwell-Experimente nicht berücksichtigt. Ungeachtet dessen wiegt ein geringeres Risiko für systemische Toxizitäten den möglichen Nachteil einer verminderten parakrinen Stimulation durch RD-IL15 wahrscheinlich auf. Dies lässt NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen als sicheres Zellprodukt für einen *in vivo* Einsatz erscheinen.

5.3 Antitumoraktivität GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen *in vivo*

Die *in vivo* Aktivität der hier generierten GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen wurde in einem metastatischen UKF-NB3-Neuroblastom-Xenograft- und in einem EL4-Lymphom-Allograftmodell in NSG-Mäusen überprüft. In beiden Mausmodellen erlangten tumortragende Mäuse, welche mit CAR-NK-92-Zellen behandelt wurden, jedoch keinen Überlebensvorteil im Vergleich zu den Gruppen, welche entweder zellfreies Injektionsmedium oder parentale NK-92-Zellen erhalten hatten (siehe Abb. 4.29 und Abb. 4.34). Der ausbleibende Therapieerfolg nach Behandlung mit NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen kann dabei nicht auf eine generell fehlende CAR-Funktionalität zurückgeführt werden, die ja in vorangegangenen *in vitro* - Experimenten bestätigt wurde. Die Abhängigkeit der Lyse GD₂-exprimierender Tumorzellen von der Aktivität des CARs hu14.18.28.z wurde dabei mittels Kompetitionssassay nachgewiesen.

Im Neuroblastom-Xenograftmodell zeigte sich bei der Mehrheit der Mäuse, welchen parentale oder modifizierte NK-92-Zellen systemisch injiziert wurden, eine anhand der Biolumineszenzsignale (*Bioluminescence imaging*, BLI) nachweisbare Verlangsamung des Tumorwachstums. Bei Mäusen, welche ausschließlich zellfreies Injektionsmedium erhielten, wurde hingegen ab Tag 45 ein signifikantes Tumorwachstum beobachtet. Zwischen den beiden Gruppen, welche mit parentalen NK-92- oder NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen behandelt wurden, gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied im Tumorwachstum beziehungsweise im medianen Überleben (siehe Abb. 4.27 und 4.29). Es ist in diesem Fall jedoch zu berücksichtigen, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in beiden Behandlungsgruppen Mäuse noch während des Therapiezeitraums aufgrund des Eintretens der festgelegten Abbruchkriterien euthanasiert werden mussten. Bei diesen Tieren wurde mittels BLI eine hohe Last an Tumorzellen im Gehirn festgestellt. Ein mögliches Einwandern GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen in derartige Hirnmetastasen ist aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (*Blood-Brain Barrier*, BBB) eingeschränkt. So konnte in präklinischen Studien unserer Gruppe bei der Behandlung von Glioblastomen keine Infiltration intrakranieller Tumoren nach intravenöser Verabreichung ErbB2-spezifischer CAR-NK-92-Zellen festgestellt werden (Doktorarbeit Sabrina Genßler). Diesem kann allerdings durch eine gleichzeitige Behandlung mit *Focused ultrasound* (FUS)

entgegengewirkt werden. Studien von Alkins et al. zeigten, dass ein kombinatorischer Therapieansatz aus FUS und der systemischen Applikation ErbB2-spezifischer CAR-NK-92-Zellen die Passage der Zellen über die BBB und anschließende Lokalisierung in Brustkrebsmetastasen im Gehirn ermöglicht [Alkins et al., 2016]. Ein weiterer Aspekt, der den Vergleich der Behandlungsgruppen erschwert, ist die generell variable Invasivität und Lokalisation der Tumorzellen innerhalb und zwischen den Gruppen. Mittels beispielhafter HE-Färbungen konnten Metastasen unter anderem im Gehirn, in der Leber und in der Niere festgestellt werden (siehe Abb. 4.28). Die Lokalisierung von Metastasen in Hochrisiko-Neuroblastom-Patienten wurde in einer Studie untersucht, wofür alle 648 Patienten der CCG (*Children's Cancer Group*)-Studien 3881 und 3891 eingebunden wurden. Hierbei zeigte sich, dass sich metastatische Absiedlungen primär im Knochenmark (70,5 %) und Knochen (55,7 %) fanden. Ein Drittel der untersuchten Patienten wiesen Metastasen in Lymphknoten (30,9 %) und Leber (29,6 %) auf, 18,2 % der Metastasen waren intrakraniell und orbital lokalisiert [DuBois et al., 1999]. Ein weiterer Faktor, weshalb ein möglicher Vorteil GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen zur Behandlung des UKF-NB3-Neuroblastoms im Vergleich zu parentalen NK-92 nicht ermittelt werden konnte, ist die hohe intrinsische NK-Zell-Sensitivität der UKF-NB3-Zelllinie, welche *in vitro* von unmodifizierten NK-92-Zellen bei einem E:T-Verhältnis von 10:1 bereits zu 28,6 % ± 1,3 % lysiert wurde (siehe Abb. 4.7, B). Möglicherweise reicht dies aus, um in *in vivo* Modellen ähnliche Effekte wie durch die Behandlung mit CAR-NK-92-Zellen hervorzurufen. So wurde anhand der BLI-Messungen in der Kontrollgruppe, welcher Injektionsmedium injiziert wurde, ein konstantes Tumorwachstum beobachtet, während das Wachstum in beiden Behandlungsgruppen bis auf ein Tier der CAR-NK-92-Gruppe zunächst verzögert war (siehe Abb. 4.27). Dies erschwerte einen Vergleich der Gruppen, welche NK-92- oder NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15 erhielten.

Im Fall des EL4-Lymphom-Allograftmodells konnten im Rahmen eines Dosisfindungsexperiments Luciferase-exprimierende EL4-Zellen (EL4/Luc) in allen untersuchten Organen lokalisiert werden, wobei sich Signale verstärkt in Niere und Lunge fanden (siehe Abb. 4.31). Im Behandlungsexperiment zeigte sich ab Tag 12 nach Tumorinokulation eine rapide Tumorprogression, die sich anders als beim vorangegangenen Xenograftmodell in einem homogenen Tumorphänotyp äußerte (siehe Abb. 4.33). Aufgrund des aggressiven Tumorwachstums mussten alle Mäuse innerhalb des Behandlungszeitraums, spätestens nach 17 Tagen, euthanasiert werden. Eine erhöhte therapeutische Wirkung von NK-92/hu14.18.28.z- und NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen im Vergleich zu parentalen NK-92-Zellen oder der unbehandelten Kontrolle konnte aufgrund dieses rapiden Tumorwachstums weder anhand der BLI-Werte noch des medianen Überlebens nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.33 und 4.34). Um dennoch eine möglicherweise begrenzte Antitumoraktivität der CAR-NK-92-Zellen zu ermitteln, welche sich nicht in den *in vivo* Biolumineszenz-Messungen widerspiegelte, wurde nach Euthanasie die Milz tumortragender Mäuse

isoliert und auf den Gehalt von EL4/Luc-Zellen überprüft (siehe Abb. 4.35). Hierfür wurden Milzzellen vereinzelt und auf Expression von GD₂ und dem Marker sfGFP durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte jedoch kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe im Anteil der GD₂⁺sfGFP⁺-, GD₂⁺sfGFP⁻- und GD₂⁻sfGFP⁺-Populationen festgestellt werden. GD₂⁺sfGFP⁺-Tumorzellen stellten in allen untersuchten Gruppen den Hauptteil innerhalb der Splenozyten-Population dar, während der prozentuale Anteil an Tumorzellen, welche GD₂- oder sfGFP-negativ waren, unter 10 % lag. GD₂⁺sfGFP⁻-Zellen definieren sich durch die weiter vorhandene Expression des Zielantigens bei Herunterregulierung der Luciferase. Dieser Effekt wurde ebenfalls *in vitro* bei EL4/Luc-Zellen nach Erlangen einer zu hohen Zelldichte beobachtet und kann durch ein mögliches *Silencing* des SFFV-Promotors erklärt werden (Daten nicht gezeigt). Im Fall der *in vivo* Analyse kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um autologe, GD₂-positive Zellen handelt, da solche bei der Analyse von Splenozyten nicht-tumortragender Mäuse als Negativkontrolle nicht gefunden wurden (Daten nicht gezeigt).

Die GD₂⁻sfGFP⁺-Subpopulation ist hingegen von einer verminderten GD₂-Expression geprägt. Dies könnte zumindest im Prinzip auf einen möglichen *Escape*-Mechanismus der EL4/Luc-Zellen nach Selektion durch GD₂-spezifische CAR-NK-92-Zellen zurückzuführen sein. In anderen Studien wurde allerdings kein Einfluss zielgerichteter Immuntherapien auf die GD₂-Expression festgestellt. So wurde unter anderem bei Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem Neuroblastom, welche zuvor eine mAb-basierte Immuntherapie erhalten hatten, keine Herunterregulierung von GD₂ beobachtet. Lediglich bei einem Patienten war die Expression des Diasialogangliosids nicht mehr nachweisbar, wobei in diesem Fall auch eine Veränderung des Tumorphänotyps festgestellt wurde [Kramer et al., 2001]. Hingegen wurde die Abspaltung des Gangliosids GD₂ in diversen Tumorentitäten detektiert und äußerte sich dort in einer erhöhten GD₂-Konzentration im Serum von Patienten, welche Tumoren mit gesteigerter Invasivität aufwiesen [Wu et al., 1987; Portoukalian et al., 1993]. Bei dem hier untersuchten metastasierenden EL4-Modell machten GD₂-negative Tumorzellen nur einen geringen Anteil innerhalb der Splenozyten-Population aus. Somit kann eine mögliche Hemmung der Antitumoraktivität der CAR-NK-92-Zellen oder eine eventuell erhöhte Metastasierung durch *Shedding* von GD₂ zumindest innerhalb der Milz ausgeschlossen werden. Das Serum oder andere betroffene Organe wurden in diesem Zusammenhang jedoch nicht untersucht.

Neben dem Fehlen CAR-spezifischer Effekte konnte in beiden Mausmodellen auch kein Effekt von sekretiertem RD-IL15 ermittelt werden. Dies war angesichts der in dieser Arbeit generierten *in vitro* Daten unerwartet, da in diesen Experimenten eine deutliche stimulatorische Wirkung des IL-15-Superagonisten nachgewiesen worden war. Es ist jedoch zu bedenken, dass zum einen der heterogene Tumorphänotyp im UKF-NB3-Neuroblastommodell, zum anderen die hohe intrinsische NK-Zell-Sensitivität von UKF-NB3-Zellen einen direkten Vergleich zwischen parentalen NK-92-Zellen

und RD-IL15-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen erschweren. So stellt der Einsatz GD₂-positiver, aber ansonsten NK-Zell-resistenter Tumorzellen *in vivo* einen möglicherweise geeigneteren Ansatz dar, um die Wirksamkeit der CAR-Effektorzellen und einen möglichen additiven Effekt des IL-15-Superagonisten zu untersuchen. In einer *in vivo* Studie einer anderen Arbeitsgruppe führte die Behandlung mit IL-15-sekretierenden, GD₂-spezifischen NKT-Zellen unter anderem in einem metastatischen CHLA-255-Neuroblastom-Mausmodell zu einem verlängerten Überleben und einer erhöhten Antitumoraktivität im Vergleich zu unmodifizierten NKT-Zellen oder CAR-NKT-Zellen ohne ektopische IL-15-Expression. In einem vorangegangenen *in vitro* Zytotoxizitätsassay zeigte sich die dort eingesetzte Neuroblastomzelllinie CHLA-255 sensitiv gegenüber CAR-NKT-Zellen, war jedoch resistent gegenüber parentalen NKT-Zellen [Xu et al., 2019]. Das als Alternative für das UKF-NB3-Xenograftmodell entwickelte EL4-Lymphom-Allograftmodell erwies sich leider aufgrund der rapiden Tumorprogression als ungeeignet, einen möglichen therapeutischen Effekt der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen nachzuweisen.

5.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit generierten GD₂-spezifischen CAR-NK-92-Zellen zeigten eine erhöhte Antitumoraktivität gegenüber unterschiedlichen GD₂-positiven Tumorzellen *in vitro*. Ebenso wurde nachgewiesen, dass von NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen funktionelles RD-IL15 in ausreichenden Mengen sekretiert wird, um die Produzentenzellen selbst autokrin und umgebende Immunzellen parakrin zu stimulieren. In den durchgeführten *in vivo* Experimenten zeigten CAR-NK-92-Zellen jedoch im Vergleich zu parentalen NK-92-Zellen keine erhöhte Antitumoraktivität gegenüber GD₂-positiven Tumoren. Dabei konnte auch kein Vorteil der Behandlung mit Zytokin-sekretierenden CAR-NK-92-Zellen festgestellt werden. Ziel weiterführender Arbeiten sollte daher insbesondere die Verbesserung der *in vivo* Aktivität der untersuchten Zellen sein.

Eine mögliche Strategie zur weiteren Optimierung RD-IL15-sekretierender CAR-NK-92-Zellen ist die Hemmung von CISH (*Cytokine Inducible SH2-containing protein*), welches der SOCS (*Suppressors Of Cytokine Signaling*)-Proteinfamilie angehört [Delconte et al., 2016]. CISH ist ein negativer Regulator der IL-15-vermittelten Signalweiterleitung in NK-Zellen. So wiesen NK-Zellen *Cish*-depletierter Mäuse (*Cish*^{-/-}) sowohl eine erhöhte Proliferation und Langlebigkeit als auch eine gesteigerte Antitumoraktivität auf. Der Einsatz CISH-spezifischer *Immune checkpoint*-Inhibitoren könnte die autokrine Wirkung des IL-15-Superagonisten verstärken und so zu einer lang anhaltenden Expansion und Antitumoraktivität der NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen *in vivo* führen.

Um möglichen mit IL-15 assoziierten Toxizitäten entgegenzuwirken, könnten Zytokin-sekretierende CAR-NK-92-Zellen zusätzlich genetisch modifiziert werden. Eine Möglichkeit stellen sogenannte

Safety switch-Gene wie iCas9 dar [Gargett und Brown, 2014]. iCas9 enthält den intrazellulären Teil der Caspase 9, fusioniert an eine Domäne, welche AP1903 bindet. Nach Gabe von AP1903 führt dessen Bindung zur Dimerisierung der Caspase 9 und letztendlich zur Einleitung der Apoptose in den betreffenden Zellen. IL-15-sekretierende CAR-Effektorzellen werden bereits mit diesem System in klinischen Studien zur Behandlung diverser Tumorentitäten eingesetzt (z.B. NCT03056339, NCT03721068).

Um den therapeutischen Effekt GD₂-spezifischer CAR-NK-92-Zellen und den zusätzlichen Einfluss von sekretiertem RD-IL15 *in vivo* besser ermitteln zu können, sollte der Fokus in zukünftigen Arbeiten auf die Entwicklung eines besser geeigneten Mausmodells gelegt werden. Xenograftmodelle mit lokal begrenzten, subkutan oder orthotop transplantierten Neuroblastom-Tumoren stellen hierbei eine mögliche Alternative dar. Neben Zelllinien sollte auch die Nutzung von Patientenmaterial in Betracht gezogen werden. PDX (*Patient-derived Xenograft*)-Modelle spiegeln die Heterogenität solider Tumoren wider und stellen hierdurch ein passendes präklinisches Modell dar [Kamili et al., 2020]. Um die mit IL-15 einhergehende immunstimulatorische Wirkung auf *bystander* Zellen zu untersuchen, könnten immunkompetente Mausmodelle herangezogen werden. Diese könnten Aufschluss darüber geben, ob der durch NK-92/hu14.18.28.z_RD-IL15-Zellen sekretierte IL-15-Superagonist einen additiven Effekt durch die Aktivierung endogener Immunzellen hat.

6 Literaturverzeichnis

Abel, Tobias, Ebtisam El Filali, Johan Waern, Irene C. Schneider, Qinggong Yuan, Robert C. Münch, Meike Hick, Gregor Warnecke, Nodir Madrahimov, Roland E. Kontermann, Jörg Schüttrumpf, Ulrike C. Müller, Jurgen Seppen, Michael Ott, and Christian J. Buchholz. 2013. 'Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells', *Blood*, 122: 2030-38.

Abemayor, E. 1992. 'The effects of retinoic acid on the in vitro and in vivo growth of neuroblastoma cells', *Laryngoscope*, 102: 1133-49.

Ahmed, Mahiuddin, and Nai-Kong V. Cheung. 2014. 'Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy', *FEBS Letters*, 588: 288-97.

Albertini, M. R., R. K. Yang, E. A. Ranheim, J. A. Hank, C. L. Zuleger, S. Weber, H. Neuman, G. Hartig, T. Weigel, D. Mahvi, M. B. Henry, R. Quale, T. McFarland, J. Gan, L. Carmichael, K. Kim, H. Loibner, S. D. Gillies, and P. M. Sondel. 2018. 'Pilot trial of the hu14.18-IL2 immunocytokine in patients with completely resectable recurrent stage III or stage IV melanoma', *Cancer Immunol Immunother*, 67: 1647-58.

Albertini, Mark R., Jacquelyn A. Hank, Brian Gadbow, Jordan Kostlevy, Jennifer Haldeman, Heidi Schalch, Jacek Gan, KyungMann Kim, Jens Eickhoff, Stephen D. Gillies, and Paul M. Sondel. 2012. 'Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61: 2261-71.

Alizadeh, Darya, Robyn A Wong, Xin Yang, Dongrui Wang, Joseph R Pecoraro, Cheng-Fu Kuo, Brenda Aguilar, Yue Qi, David K Ann, and Renate Starr. 2019. 'IL-15-mediated reduction of mTORC1 activity preserves the stem cell memory phenotype of CAR-T cells and confers superior antitumor activity', *Cancer immunology research*.

Alkins, Ryan, Alison Burgess, Robert Kerbel, Winfried S Wels, and Kullervo Hynynen. 2016. 'Early treatment of HER2-amplified brain tumors with targeted NK-92 cells and focused ultrasound improves survival', *Neuro-oncology*, 18: 974-81.

Altvater, Bianca, Silke Landmeier, Sibylle Pscherer, Jaane Temme, Katharina Schweer, Sareetha Kailayangiri, Dario Campana, Heribert Juergens, Martin Pule, and Claudia Rossig. 2009. '2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15: 4857-66.

Ames, B N, L S Gold, and W C Willett. 1995. 'The causes and prevention of cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 5258-65.

Andrade, F., S. Roy, D. Nicholson, N. Thornberry, A. Rosen, and L. Casciola-Rosen. 1998. 'Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis', *Immunity*, 8: 451-60.

Anfossi, Nicolas, Pascale André, Sophie Guia, Christine S. Falk, Sophie Roetyncck, C. Andrew Stewart, Violette Bresso, Coralie Frassati, Denis Reviron, Derek Middleton, François Romagné, Sophie Ugolini, and Eric Vivier. 2006. 'Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I', *Immunity*, 25: 331-42.

- Arai, S., R. Meagher, M. Swearingen, H. Myint, E. Rich, J. Martinson, and H. Klingemann. 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.
- Assarsson, Erika, Taku Kambayashi, John D Schatzle, Sven O Cramer, Arne von Bonin, Peter E Jensen, Hans-Gustaf Ljunggren, and Benedict J Chambers. 2004. 'NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions', *The Journal of Immunology*, 173: 174-80.
- Atkins, Michael B, Michael T Lotze, Janice P Dutcher, Richard I Fisher, Geoffrey Weiss, Kim Margolin, Jeff Abrams, Mario Sznol, David Parkinson, and Michael Hawkins. 1999. 'High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993', *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2105-05.
- Attiyeh, Edward F, Wendy B London, Yael P Mossé, Qun Wang, Cynthia Winter, Deepa Khazi, Patrick W McGrady, Robert C Seeger, A Thomas Look, and Hiroyuki Shimada. 2005. 'Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma', *New England Journal of Medicine*, 353: 2243-53.
- Basak, Saroj, Brigitte Birebent, Enkhtsetseg Purev, Rajasekharan Somasundaram, Haruhiko Maruyama, Jan Zaloudik, Rolf Swoboda, Wolfgang Strittmatter, Weiping Li, Albrecht Luckenbach, Hong Song, Jian Li, Katrin Sproesser, Dupont Guerry, Sridar Nair, Koichi Furukawa, and Dorothee Herlyn. 2003. 'Induction of cellular immunity by anti-idiotypic antibodies mimicking GD2 ganglioside', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52: 145-54.
- Baslund, Bo, Niels Tvede, Bente Danneskiold-Samsøe, Per Larsson, Gabriel Panayi, Joergen Petersen, Lars J. Petersen, Frank J. M. Beurskens, Janine Schuurman, Jan G. J. van de Winkel, Paul W. H. I. Parren, J. Alastair Gracie, Sarah Jongbloed, Foo Y. Liew, and Iain B. McInnes. 2005. 'Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept study', *Arthritis & Rheumatism*, 52: 2686-92.
- Battula, Venkata Lokesh, Yuexi Shi, Kurt W. Evans, Rui-Yu Wang, Erika L. Spaeth, Rodrigo O. Jacamo, Rudy Guerra, Aysegul A. Sahin, Frank C. Marini, Gabriel Hortobagyi, Sendurai A. Mani, and Michael Andreeff. 2012. 'Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis', *The Journal of clinical investigation*, 122: 2066-78.
- Becknell, Brian, and Michael A. Caligiuri. 2005. 'Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells.' in Frederick W. Alt (ed.), *Advances in immunology* (Academic Press).
- Bergamaschi, C., M. Rosati, R. Jalah, A. Valentin, V. Kulkarni, C. Alicea, G. M. Zhang, V. Patel, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 2008. 'Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity', *J Biol Chem*, 283: 4189-99.
- Bergamaschi, Cristina, Jenifer Bear, Margherita Rosati, Rachel Kelly Beach, Candido Alicea, Raymond Sowder, Elena Chertova, Steven A. Rosenberg, Barbara K. Felber, and George N. Pavlakis. 2012. 'Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15R α in human and mouse serum', *Blood*, 120: e1-e8.
- Berrien-Elliott, Melissa M., Michelle Becker-Hapak, Amanda F. Cashen, Miriam Jacobs, Pamela Wong, Mark Foster, Ethan McClain, Sweta Desai, Patrick Pence, Sarah Cooley, Claudio Brunstein, Feng Gao, Camille N. Abboud, Geoffrey L. Uy, Peter Westervelt, Meagan A. Jacoby, Iskra Pusic, Keith E. Stockerl-Goldstein, Mark A. Schroeder, John F. DiPersio, Patrick Soon-Shiong, Jeffrey S. Miller, and Todd A. Fehniger. 2022. 'Systemic IL-15 promotes allogeneic cell rejection in patients treated with natural killer cell adoptive therapy', *Blood*, 139: 1177-83.

- Bhat, Rauf, and Carsten Watzl. 2007. 'Serial killing of tumor cells by human natural killer cells—enhancement by therapeutic antibodies', *PloS one*, 2: e326.
- Biederstädt, Alexander, and Katayoun Rezvani. 2021. 'Engineering the next generation of CAR-NK immunotherapies', *International journal of hematology*, 114: 554-71.
- Björkström, Niklas K., Peggy Riese, Frank Heuts, Sandra Andersson, Cyril Fauriat, Martin A. Ivarsson, Andreas T. Björklund, Malin Flodström-Tullberg, Jakob Michaëlsson, Martin E. Rottenberg, Carlos A. Guzmán, Hans-Gustaf Ljunggren, and Karl-Johan Malmberg. 2010. 'Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education', *Blood*, 116: 3853-64.
- Blom, Bianca, and Hergen Spits. 2006. 'Development of human lymphoid cells', *Annual review of immunology*, 24: 287-320.
- Bodmer, Jean-Luc, Pascal Schneider, and Jürg Tschopp. 2002. 'The molecular architecture of the TNF superfamily', *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 19-26.
- Boissel, Laurent, Monica Betancur, Weiquan Lu, Daniela Krause, Richard Van Etten, Winfried Wels, and Hans Klingemann. 2013. 'Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity', *Oncolmmunology*, 2: e26527.
- Boivin, Wendy Anne, Dawn Michelle Cooper, Paul Ryan Hiebert, and David James Granville. 2009. 'Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma', *Laboratory Investigation*, 89: 1195-220.
- Boos, Markus D., Kevin Ramirez, and Barbara L. Kee. 2008. 'Extrinsic and intrinsic regulation of early natural killer cell development', *Immunologic Research*, 40: 193-207.
- Bordignon, C., C. Carlo-Stella, M. P. Colombo, A. De Vincentiis, L. Lanata, R. M. Lemoli, F. Locatelli, A. Olivieri, D. Rondelli, P. Zanon, and S. Tura. 1999. 'Cell therapy: achievements and perspectives', *Haematologica*, 84: 1110-49.
- Brodeur, Garrett M. 2003. 'Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma', *Nature Reviews Cancer*, 3: 203-16.
- Bryceson, Yenan T., Michael E. March, Hans-Gustaf Ljunggren, and Eric O. Long. 2006. 'Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion', *Blood*, 107: 159-66.
- Budagian, Vadim, Elena Bulanova, Ralf Paus, and Silvia Bulfone-Paus. 2006. 'IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe', *Cytokine & growth factor reviews*, 17: 259-80.
- Burger, Michael C., Congcong Zhang, Patrick N. Harter, Annette Romanski, Florian Strassheimer, Christian Senft, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, and Winfried S. Wels. 2019. 'CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 10.
- Burnet, FM. 1970. 'The concept of immunological surveillance', *Immunological Aspects of Neoplasia*, 13: 1-27.

Burnet, Macfarlane. 1957. 'Cancer—a biological approach: III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications', *British medical journal*, 1: 841.

Caligiuri, Michael A. 2008. 'Human natural killer cells', *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112: 461-69.

Campbell, James J., Shixin Qin, Derya Unutmaz, Dulce Soler, Kristine E. Murphy, Martin R. Hodge, Lijun Wu, and Eugene C. Butcher. 2001. 'Unique Subpopulations of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire1', *The Journal of Immunology*, 166: 6477-82.

Chaudhry, Kajal, Ashley Geiger, Ehsan Dowlati, Haili Lang, Danielle K. Sohai, Eugene I. Hwang, Christopher A. Lazarski, Eric Yvon, Matthias Holdhoff, Richard Jones, Barbara Savoldo, Conrad Russell Y. Cruz, and Catherine M. Bollard. 2022. 'Co-transducing B7H3 CAR-NK cells with the DNR preserves their cytolytic function against GBM in the presence of exogenous TGF- β ', *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 27: 415-30.

Cheever, Martin A. 2008. 'Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers', *Immunological Reviews*, 222: 357-68.

Cheever, Martin A., James P. Allison, Andrea S. Ferris, Olivera J. Finn, Benjamin M. Hastings, Toby T. Hecht, Ira Mellman, Sheila A. Prindiville, Jaye L. Viner, Louis M. Weiner, and Lynn M. Matrisian. 2009. 'The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research', *Clinical Cancer Research*, 15: 5323-37.

Chen, K. H., M. Wada, K. G. Pinz, H. Liu, X. Shuai, X. Chen, L. E. Yan, J. C. Petrov, H. Salman, L. Senzel, E. L. H. Leung, X. Jiang, and Y. Ma. 2018. 'A compound chimeric antigen receptor strategy for targeting multiple myeloma', *Leukemia*, 32: 402-12.

Chen, Yi-Xin, Xiao-Wen Chen, Chang-Gang Li, Li-Jie Yue, Hui-Rong Mai, and Fei-Qiu Wen. 2013. 'Effect of tumor gangliosides on tyrosine phosphorylation of p125FAK in platelet adhesion to collagen', *Oncol Rep*, 29: 343-48.

Chen, Yuhui, Chuang Sun, Elisa Landoni, Leonid Metelitsa, Gianpietro Dotti, and Barbara Savoldo. 2019. 'Eradication of Neuroblastoma by T Cells Redirected with an Optimized GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and Interleukin-15GD2. CAR-Ts-Expressing IL15 Eradicate Neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 25: 2915-24.

Cheresh, David A, Michael D Pierschbacher, Michael A Herzig, and Kalpana Mujoo. 1986. 'Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins', *The Journal of cell biology*, 102: 688-96.

Cheung, I. Y., N. V. Cheung, S. Modak, A. Mauguen, Y. Feng, E. Basu, S. S. Roberts, G. Ragupathi, and B. H. Kushner. 2021. 'Survival Impact of Anti-GD2 Antibody Response in a Phase II Ganglioside Vaccine Trial Among Patients With High-Risk Neuroblastoma With Prior Disease Progression', *J Clin Oncol*, 39: 215-26.

Cheung, N-K v, Hillard Lazarus, Floro D Miraldi, Carlos R Abramowsky, Steven Kallick, Ulla M Saarinen, Thomas Spitzer, Sarah E Strandjord, Peter F Coccia, and Nathan A Berger. 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.

- Cheung, Nai-Kong V, Hongfen Guo, Jian Hu, Dimiter V Tassev, and Irene Y Cheung. 2012. 'Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo', *Oncolmmunology*, 1: 477-86.
- Cheung, Nai-Kong V, Ulla M Saarinen, John E Neely, Bonnie Landmeier, Duffy Donovan, and Peter F Coccia. 1985. 'Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells', *Cancer Research*, 45: 2642-49.
- Chiesa, Mariella Della, Massimo Vitale, Simona Carlomagno, Guido Ferlazzo, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. 2003. 'The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors', *European Journal of Immunology*, 33: 1657-66.
- Chmielewski, Markus, and Hinrich Abken. 2015. 'TRUCKs: the fourth generation of CARs', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15: 1145-54.
- Cinatl, J, ES Gussetis, J Cinatl Jr, U Ebener, M Mainke, D Schwabe, HW Doerr, B Kornhuber, and V Gerein. 1990. 'Differentiation arrest in neuroblastoma cell culture', *J Cancer Res Clin Oncol*, 116.
- Conlon, Kevin C, Enrico Lugli, Hugh C Welles, Steven A Rosenberg, Antonio Tito Fojo, John C Morris, Thomas A Fleisher, Sigrid P Dubois, Liyanage P Perera, and Donn M Stewart. 2015. 'Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 33: 74.
- Cooley, Sarah, Fiona He, Veronika Bachanova, Gregory M. Vercellotti, Todd E. DeFor, Julie M. Curtsinger, Paul Robertson, Bartosz Grzywacz, Kevin C. Conlon, Thomas A. Waldmann, David H. McKenna, Bruce R. Blazar, Daniel J. Weisdorf, and Jeffrey S. Miller. 2019. 'First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia', *Blood Advances*, 3: 1970-80.
- Cooper, Megan A., Todd A. Fehniger, and Michael A. Caligiuri. 2001. 'The biology of human natural killer-cell subsets', *Trends in Immunology*, 22: 633-40.
- Davis, H. E., M. Rosinski, J. R. Morgan, and M. L. Yarmush. 2004. 'Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation', *Biophys J*, 86: 1234-42.
- de Saint Basile, Geneviève, Gaël Ménasché, and Alain Fischer. 2010. 'Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules', *Nature Reviews Immunology*, 10: 568-79.
- Delconte, Rebecca B, Tatiana B Kolesnik, Laura F Dagley, Jai Rautela, Wei Shi, Eva M Putz, Kimberley Stannard, Jian-Guo Zhang, Charis Teh, and Matt Firth. 2016. 'CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity', *Nature immunology*, 17: 816-24.
- Demaison, Christophe, Kathryn Parsley, Gaby Brouns, Michaela Scherr, Karin Battmer, Christine Kinnon, Manuel Grez, and Adrian J. Thrasher. 2002. 'High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter', *Human Gene Therapy*, 13: 803-13.

Döbbeling, Udo, Reinhard Dummer, Elisabeth Laine, Natascha Potoczna, Jian-Zhong Qin, and Günter Burg. 1998. 'Interleukin-15 Is an Autocrine/Paracrine Viability Factor for Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells', *Blood*, 92: 252-58.

Dolstra, Harry, Mieke W.H. Roeven, Jan Spanholtz, Basav N. Hangalapura, Marleen Tordoir, Frans Maas, Marij Leenders, Fenna Bohme, Nina Kok, Carel Trilsbeek, Jos Paardekooper, Aniek B. van der Waart, Peter E. Westerweel, Tjeerd J.F. Snijders, Jan Cornelissen, Gerard Bos, Hans F.M. Pruijt, Aniek O. de Graaf, Bert A. van der Reijden, Joop H. Jansen, Arnold van der Meer, Gerwin Huls, Jeannette Cany, Frank Preijers, Nicole M.A. Blijlevens, and Nicolaas M. Schaap. 2017. 'Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients', *Clinical Cancer Research*, 23: 4107-18.

Doucet, Christelle, Raffaella Meazza, Corinne Pottin-Clemenceau, Marco Scudeletti, Danielle Brouty-Boye, Silvano Ferrini, Abdelkrim Alileche, Yassine Taoufik, Claude Jasmin, Bruno Azzarone, and Francesco Indiveri. 1997. 'Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient', *Melanoma Research*, 7: S7-S17.

Dubois, Sigrid, Jennifer Mariner, Thomas A Waldmann, and Yutaka Tagaya. 2002. 'IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells', *Immunity*, 17: 537-47.

DuBois, Steven G, Yan Kalika, John N Lukens, Garrett M Brodeur, Robert C Seeger, James B Atkinson, Gerald M Haase, C Thomas Black, Carlos Perez, and Hiroyuki Shimada. 1999. 'Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival', *Journal of pediatric hematology/oncology*, 21: 181-89.

Dunn, Gavin P, Allen T Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 2002. 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', *Nature immunology*, 3: 991-98.

Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2004. 'The Three Es of Cancer Immunoediting', *Annual review of immunology*, 22: 329-60.

Ehrlich, P. 1909. 'Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung.', *Ned Tijdschr Geneeskde*, 5: 73–290.

Eleveld, Thomas F., Derek A. Oldridge, Virginie Bernard, Jan Koster, Leo Colmet Daage, Sharon J. Diskin, Linda Schild, Nadia Bessoltane Bentahar, Angela Bellini, Mathieu Chicard, Eve Lapouble, Valérie Combaret, Patricia Legoix-Né, Jean Michon, Trevor J. Pugh, Lori S. Hart, JulieAnn Rader, Edward F. Attiyeh, Jun S. Wei, Shile Zhang, Arlene Naranjo, Julie M. Gastier-Foster, Michael D. Hogarty, Shahab Asgharzadeh, Malcolm A. Smith, Jaime M. Guidry Auvil, Thomas B. K. Watkins, Danny A. Zwijnenburg, Marli E. Ebus, Peter van Sluis, Anne Hakkert, Esther van Wezel, C. Ellen van der Schoot, Ellen M. Westerhout, Johannes H. Schulte, Godelieve A. Tytgat, M. Emmy M. Dolman, Isabelle Janoueix-Lerosey, Daniela S. Gerhard, Huib N. Caron, Olivier Delattre, Javed Khan, Rogier Versteeg, Gudrun Schleiermacher, Jan J. Molenaar, and John M. Maris. 2015. 'Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations', *Nature genetics*, 47: 864-71.

Ellery, Jonathan M., and Peter J. Nicholls. 2002. 'Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor', *Cytokine & growth factor reviews*, 13: 27-40.

Elpek, Kutlu G., Mark P. Rubinstein, Angelique Bellemare-Pelletier, Ananda W. Goldrath, and Shannon J. Turley. 2010. 'Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15R α complexes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 21647-52.

- Eshhar, Zelig, Tova Waks, Gideon Gross, and Daniel G Schindler. 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: 720-24.
- Esser, R., T. Muller, D. Stefes, S. Kloess, D. Seidel, S. D. Gillies, C. Aperlo-Iffland, J. S. Huston, C. Uherek, K. Schonfeld, T. Tonn, N. Huebener, H. N. Lode, U. Koehl, and W. S. Wels. 2012. 'NK cells engineered to express a GD2 -specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin', *J Cell Mol Med*, 16: 569-81.
- Fehniger, T. A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J. B. VanDeusen, M. A. Cooper, S. M. Florea, A. G. Freud, M. L. Robinson, J. Durbin, and M. A. Caligiuri. 2001. 'Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells', *J Exp Med*, 193: 219-31.
- Fehniger, Todd A., and Michael A. Caligiuri. 2001. 'Interleukin 15: biology and relevance to human disease', *Blood*, 97: 14-32.
- Fehniger, Todd A., Megan A. Cooper, and Michael A. Caligiuri. 2002. 'Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer', *Cytokine & growth factor reviews*, 13: 169-83.
- Felices, M., A. J. Lenvik, R. McElmurry, S. Chu, P. Hinderlie, L. Bendzick, M. A. Geller, J. Tolar, B. R. Blazar, and J. S. Miller. 2018. 'Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect', *JCI Insight*, 3.
- Fisher, Richard I, Steven A Rosenberg, and Gwendolyn Fyfe. 2000. 'Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma', *The cancer journal from Scientific American*, 6: S55-7.
- Frutoso, Marie, Sébastien Morisseau, Fella Tamzalit, Agnès Quéméner, Dihia Meghnem, Isabelle Leray, Yannick Jacques, and Erwan Mortier. 2018. 'Emergence of NK cell hyporesponsiveness after two IL-15 stimulation cycles', *The Journal of Immunology*, 201: 493-506.
- Fyfe, Gwendolyn, Richard I Fisher, Steven A Rosenberg, Mario Sznol, David R Parkinson, and Arthur C Louie. 1995. 'Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy', *Journal of Clinical Oncology*, 13: 688-96.
- Gargett, Tessa, and Michael P Brown. 2014. 'The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells', *Frontiers in pharmacology*, 5: 235.
- Geller, M. A., S. Cooley, P. L. Judson, R. Ghebre, L. F. Carson, P. A. Argenta, A. L. Jonson, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Curtsinger, D. McKenna, K. Dusenbery, R. Bliss, L. S. Downs, and J. S. Miller. 2011. 'A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer', *Cytotherapy*, 13: 98-107.
- Gill, Saar, Adrienne E. Vasey, Alysha De Souza, Jeanette Baker, Aaron T. Smith, Holbrook E. Kohrt, Mareike Florek, Kenneth D. Gibbs, Jr, Keri Tate, David S. Ritchie, and Robert S. Negrin. 2012. 'Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells', *Blood*, 119: 5758-68.

- Gillies, Stephen D, Kin-Ming Lo, and John Wesolowski. 1989. 'High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes', *Journal of immunological methods*, 125: 191-202.
- Gillies, Stephen D, Edward B Reilly, Kin-Ming Lo, and Ralph A Reisfeld. 1992. 'Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 1428-32.
- Gillies, Stephen D., Yan Lan, Thore Hettmann, Beatrice Brunkhorst, Yaping Sun, Stefan O. Mueller, and Kin-Ming Lo. 2011. 'A Low-Toxicity IL-2–Based Immunocytokine Retains Antitumor Activity Despite Its High Degree of IL-2 Receptor Selectivity', *Clinical Cancer Research*, 17: 3673-85.
- Gillies, Stephen D., and Kin-Ming Lo. 2004. "Humanized Antibody (h14.18) Of The Mouse 14.18 Antibody Binding To Gd2 And Its Fusion With Il-2." In. WO: MERCK PATENT GMBH.
- Gillis, Steven, Mary M. Ferm, Winny Ou, and Kendall A. Smith. 1978. 'T Cell Growth Factor: Parameters of Production and a Quantitative Microassay for Activity', *The Journal of Immunology*, 120: 2027-32.
- Glennie, Martin J., and Peter W. M. Johnson. 2000. 'Clinical trials of antibody therapy', *Immunology today*, 21: 403-10.
- Golay, Josée, and Ronald P. Taylor. 2020. 'The Role of Complement in the Mechanism of Action of Therapeutic Anti-Cancer mAbs', *Antibodies*, 9: 58.
- Goldrath , Ananda W., Pallavur V. Sivakumar , Moira Glaccum , Mary K. Kennedy , Michael J. Bevan , Christophe Benoist , Diane Mathis , and Eric A. Butz 2002. 'Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8+ T Cells', *Journal of Experimental Medicine*, 195: 1515-22.
- Gomes-Silva, Diogo, Malini Mukherjee, Madhuwanti Srinivasan, Giedre Krenciute, Olga Dakhova, Yueting Zheng, Joaquim MS Cabral, Cliona M Rooney, Jordan S Orange, and Malcolm K Brenner. 2017. 'Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent', *Cell reports*, 21: 17-26.
- Gong, J. H., G. Maki, and H. G. Klingemann. 1994. 'Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells', *Leukemia*, 8: 652-8.
- Gotthardt, Dagmar, and Veronika Sexl. 2017. 'STATs in NK-cells: the good, the bad, and the ugly', *Frontiers in Immunology*, 7: 694.
- Grabstein, Kenneth H., June Eisenman, Kurt Shanebeck, Charles Rauch, Subhashini Srinivasan, Victor Fung, Courtney Beers, Jane Richardson, Michael A. Schoenborn, Mino Ahdieh, Lisabeth Johnson, Mark R. Alderson, James D. Watson, Anderson, Dirk M., and Judith G. Giri. 1994. 'Cloning of a T Cell Growth Factor that Interacts with the β 2; Chain of the Interleukin-2 Receptor', *Science*, 264: 965-68.
- Graham, Daniel B, Marina Cella, Emanuele Giurisato, Keiko Fujikawa, Ana V Miletic, Tracie Kloeppel, Karry Brim, Toshiyuki Takai, Andrey S Shaw, and Marco Colonna. 2006. 'Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics', *The Journal of Immunology*, 177: 2349-55.

- Grakoui, Arash, Shannon K Bromley, Cenk Sumen, Mark M Davis, Andrey S Shaw, Paul M Allen, and Michael L Dustin. 1999. 'The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation', *Science*, 285: 221-27.
- Groux, Hervé, Mike Bigler, Jan E De Vries, and Maria-Grazia Roncarolo. 1998. 'Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells', *The Journal of Immunology*, 160: 3188-93.
- Guerra, Nadia, Ying Xim Tan, Nathalie T Joncker, Augustine Choy, Fermin Gallardo, Na Xiong, Susan Knoblauch, Dragana Cado, Norman R Greenberg, and David H Raulet. 2008. 'NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy', *Immunity*, 28: 571-80.
- Habif, Guillaume, Adeline Crinier, Pascale André, Eric Vivier, and Emilie Narni-Mancinelli. 2019. 'Targeting natural killer cells in solid tumors', *Cellular & Molecular Immunology*, 16: 415-22.
- Hakomori, Sen-itiroh. 1994. 'Chapter 18 Role of gangliosides in tumor progression.' in Lars Svennerholm, Arthur K. Asbury, Ralph A. Reisfeld, Konrad Sandhoff, Kunihiko Suzuki, Guido Tettamanti and Gino Toffano (eds.), *Progress in Brain Research* (Elsevier).
- Han, Kai-ping, Xiaoyun Zhu, Bai Liu, Emily Jeng, Lin Kong, Jason L. Yovandich, Vinay V. Vyas, Warren D. Marcus, Pierre-Andre Chavaillaz, Christian A. Romero, Peter R. Rhode, and Hing C. Wong. 2011. 'IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization', *Cytokine*, 56: 804-10.
- Hanahan, Douglas. 2022. 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12: 31-46.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100: 57-70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Heczey, A., A. N. Courtney, A. Montalbano, S. Robinson, K. Liu, M. Li, N. Ghatwai, O. Dakhova, B. Liu, T. Raveh-Sadka, C. N. Chauvin-Fleurence, X. Xu, H. Ngai, E. J. Di Pierro, B. Savoldo, G. Dotti, and L. S. Metelitsa. 2020. 'Anti-GD2 CAR-NKT cells in patients with relapsed or refractory neuroblastoma: an interim analysis', *Nat Med*, 26: 1686-90.
- Herberman, Ronald B., Myrthel E. Nunn, Howard T. Holden, and David H. Lavrin. 1975. 'Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells', *International Journal of Cancer*, 16: 230-39.
- Hero, Barbara, Thorsten Simon, Ruediger Spitz, Karen Ernestus, Astrid K. Gnekow, Hans-Guenther Scheel-Walter, Dirk Schwabe, Freimut H. Schilling, Gabriele Benz-Bohm, and Frank Berthold. 2008. 'Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97', *Journal of Clinical Oncology*, 26: 1504-10.
- Imada, Kazuroni, and Warren J. Leonard. 2000. 'The Jak-STAT pathway', *Molecular Immunology*, 37: 1-11.
- Imai, Chihaya, Shotaro Iwamoto, and Dario Campana. 2005. 'Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells', *Blood*, 106: 376-83.

- Imai, CMIHARA, K Mihara, M Andreansky, IC Nicholson, CH Pui, TL Geiger, and Dario Campana. 2004. 'Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia', *Leukemia*, 18: 676-84.
- Imai, Kazue, Satoru Matsuyama, Satoshi Miyake, Kenji Suga, and Kei Nakachi. 2000. 'Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population', *The lancet*, 356: 1795-99.
- Imamura, Masaru, David Shook, Takahiro Kamiya, Noriko Shimasaki, Sally M. H. Chai, Elaine Coustan-Smith, Chihaya Imai, and Dario Campana. 2014. 'Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15', *Blood*, 124: 1081-88.
- Jiang, Tao, Caicun Zhou, and Shengxiang Ren. 2016. 'Role of IL-2 in cancer immunotherapy', *Oncolmmunology*, 5: e1163462.
- Jin, Hye Jin, Hae Yun Nam, Yun Kyong Bae, Soo Yeon Kim, I. Rang Im, Wonil Oh, Yoon Sun Yang, Soo Jin Choi, and Seong Who Kim. 2010. 'GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 1845-58.
- Johnston, James A, Chris M Bacon, David S Finbloom, Robert C Rees, David Kaplan, Kyo Shibuya, John R Ortaldo, Sanjay Gupta, Y Quing Chen, and Judy D Giri. 1995. 'Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 8705-09.
- Kailayangiri, Sareetha, Bianca Altvater, Christian Spurny, Silke Jamitzky, Sonja Schelhaas, Andreas H. Jacobs, Constanze Wiek, Katharina Roellecke, Helmut Hanenberg, Wolfgang Hartmann, Heinz Wiendl, Susann Pankratz, Jutta Meltzer, Nicole Farwick, Lea Greune, Maike Fluegge, and Claudia Rossig. 2017. 'Targeting Ewing sarcoma with activated and GD2-specific chimeric antigen receptor-engineered human NK cells induces upregulation of immune-inhibitory HLA-G', *Oncolmmunology*, 6: e1250050.
- Kamili, Alvin, Andrew J Gifford, Nancy Li, Chelsea Mayoh, Shu-Oi Chow, Timothy W Failes, Georgina L Eden, Roxanne Cadiz, Jinhan Xie, and Robyn E Lukeis. 2020. 'Accelerating development of high-risk neuroblastoma patient-derived xenograft models for preclinical testing and personalised therapy', *British journal of cancer*, 122: 680-91.
- Karre, K, HG Ljunggren, G Piontek, and R Kiessling. 1986. ' Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy', *Nature (Lond.)*, 319: 675.
- Kawalekar, Omkar U, Roddy S O'Connor, Joseph A Fraietta, Lili Guo, Shannon E McGettigan, Avery D Posey Jr, Prachi R Patel, Sonia Guedan, John Scholler, and Brian Keith. 2016. 'Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells', *Immunity*, 44: 380-90.
- Kiessling, R., Eva Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. '„Natural“ killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell', *European Journal of Immunology*, 5: 117-21.
- Kim, J. H., K. J. Lee, and S. W. Lee. 2021. 'Cancer immunotherapy with T-cell targeting cytokines: IL-2 and IL-7', *BMB Rep*, 54: 21-30.

- Kim, Jin Hee, Sang-Rok Lee, Li-Hua Li, Hye-Jeong Park, Jeong-Hoh Park, Kwang Youl Lee, Myeong-Kyu Kim, Boo Ahn Shin, and Seok-Yong Choi. 2011. 'High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice', *PLoS one*, 6: e18556.
- Kim, Sungjin, Jennifer Poursine-Laurent, Steven M. Truscott, Lonnie Lybarger, Yun-Jeong Song, Liping Yang, Anthony R. French, John B. Sunwoo, Suzanne Lemieux, Ted H. Hansen, and Wayne M. Yokoyama. 2005. 'Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules', *Nature*, 436: 709-13.
- Klingemann, H. G., and J. Martinson. 2004. 'Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications', *Cytotherapy*, 6: 15-22.
- Klingemann, H. G., E. Wong, and G. Maki. 1996. 'A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood', *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 2: 68-75.
- Kloess, S., A. Kretschmer, L. Stahl, S. Fricke, and U. Koehl. 2019. 'CAR-Expressing Natural Killer Cells for Cancer Retargeting', *Transfus Med Hemother*, 46: 4-13.
- Knudson, Karin M, James W Hodge, Jeffrey Schlom, and Sofia R Gameiro. 2020. 'Rationale for IL-15 superagonists in cancer immunotherapy', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20: 705-09.
- Koh, Crystal Y., Bruce R. Blazar, Thaddeus George, Lisbeth A. Welniak, Christian M. Capitini, Arati Raziuddin, William J. Murphy, and Michael Bennett. 2001. 'Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo', *Blood*, 97: 3132-37.
- Kontermann, Roland. 2012. "Dual targeting strategies with bispecific antibodies." In *mAbs*, 182-97. Taylor & Francis.
- Kramer, Kim, William L Gerald, Brian H Kushner, Steven M Larson, Meera Hameed, and Nai-Kong V Cheung. 2001. 'Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma', *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*, 36: 194-96.
- Kumar, Hemant, and Rachna Gupta. 2022. 'Anti-Disialoganglioside-2 Monoclonal Antibodies as an Emerging Therapeutic Approach in Treatment of High-Risk Neuroblastoma', *Current Pharmacology Reports*, 8: 112-20.
- Ladenstein, Ruth Lydia, Ulrike Poetschger, Dominique Valteau-Couanet, Juliet Gray, Roberto Luksch, Walentyna Balwierz, Victoria Castel, Shifra Ash, Maja Beck Popovic, Genevieve Laureys, Godfrey Chi Fung Chan, Ellen Ruud, Kim Vettenranta, Cormac Owens, Henrik Schroeder, Hans Loibner, Peter F Ambros, Sabine Sarnacki, Tom Boterberg, and Holger N. Lode. 2019. 'Randomization of dose-reduced subcutaneous interleukin-2 (scIL2) in maintenance immunotherapy (IT) with anti-GD2 antibody dinutuximab beta (DB) long-term infusion (LTI) in front-line high-risk neuroblastoma patients: Early results from the HR-NBL1/SIOPEN trial', *Journal of Clinical Oncology*, 37: 10013-13.
- Ladenstein, Ruth, Ulrike Pötschger, Dominique Valteau-Couanet, Roberto Luksch, Victoria Castel, Isaac Yaniv, Genevieve Laureys, Penelope Brock, Jean Marie Michon, Cormac Owens, Toby Trahair, Godfrey Chi Fung Chan, Ellen Ruud, Henrik Schroeder, Maja Beck Popovic, Guenter Schreier, Hans Loibner, Peter Ambros, Keith Holmes, Maria Rita Castellani, Mark N. Gaze, Alberto Garaventa, Andrew D. J. Pearson, and Holger N. Lode. 2018. 'Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*, 19: 1617-29.

Ladenstein, Ruth, Silke Weixler, Bianca Baykan, Matthias Bleeke, Renate Kunert, Dietmar Katinger, Ingrid Pribill, Petra Glander, Steffen Bauer, Vito Pistoia, Jean Michon, Alberto Garaventa, and Holger N. Lode. 2013. 'Ch14.18 antibody produced in CHO cells in relapsed or refractory Stage 4 neuroblastoma patients', *mAbs*, 5: 801-09.

Laetsch, Theodore W, Shannon L Maude, Susana Rives, Hidefumi Hiramatsu, Henrique Bittencourt, Peter Bader, André Baruchel, Michael Boyer, Barbara De Moerloose, and Muna Qayed. 2022. 'Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial', *Journal of Clinical Oncology*: JCO. 22.00642.

Lammie, G. A., N. K. V. Cheung, W. Gerald, M. Rosenblum, and C. Cordoncardo. 1993. 'GANGLIOSIDE GD(2) EXPRESSION IN THE HUMAN NERVOUS-SYSTEM AND IN NEUROBLASTOMAS - AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY', *Int J Oncol*, 3: 909-15.

Lanier, Lewis L. 2001. 'On guard—activating NK cell receptors', *Nature immunology*, 2: 23-27.

Lanier, Lewis L. 2008. 'Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition', *Nature immunology*, 9: 495-502.

Laskowski, Tamara J., Alexander Biederstädt, and Katayoun Rezvani. 2022. 'Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 22: 557-75.

Law, Teresa Murray, Robert J Motzer, Madhu Mazumdar, Kenneth W Sell, Philip Walther, Michael O'Connell, Amanullah Khan, Vaia Vlamis, Nicholas J Vogelzang, and Dean F Bajorin. 1995. 'Phase iii randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma', *Cancer*, 76: 824-32.

Lazarova, Mariya, Winfried S. Wels, and Alexander Steinle. 2020. 'Arming cytotoxic lymphocytes for cancer immunotherapy by means of the NKG2D/NKG2D-ligand system', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20: 1491-501.

Lenardo, Michael J. 1991. 'Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis', *Nature*, 353: 858-61.

Lin, J. X., and W. J. Leonard. 2018. 'The Common Cytokine Receptor γ Chain Family of Cytokines', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.

Liu, Dongfang, Yenan T. Bryceson, Tobias Meckel, Gaia Vasiliver-Shamis, Michael L. Dustin, and Eric O. Long. 2009. 'Integrin-Dependent Organization and Bidirectional Vesicular Traffic at Cytotoxic Immune Synapses', *Immunity*, 31: 99-109.

Liu, E., D. Marin, P. Banerjee, H. A. Macapinlac, P. Thompson, R. Basar, L. Nassif Kerbauy, B. Overman, P. Thall, M. Kaplan, V. Nandivada, I. Kaur, A. Nunez Cortes, K. Cao, M. Daher, C. Hosing, E. N. Cohen, P. Kebriaei, R. Mehta, S. Neelapu, Y. Nieto, M. Wang, W. Wierda, M. Keating, R. Champlin, E. J. Shpall, and K. Rezvani. 2020. 'Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors', *N Engl J Med*, 382: 545-53.

Liu, Sizhe, Vasiliy Galat, Yekaterina Galat, Yoo Kyung Annie Lee, Derek Wainwright, and Jennifer Wu. 2021. 'NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development', *Journal of Hematology & Oncology*, 14: 7.

Ljunggren, Hans-Gustaf, and Klas Kärre. 1990. 'In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition', *Immunology today*, 11: 237-44.

- Ljunggren, Hans-Gustaf, and Karl-Johan Malmberg. 2007. 'Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer', *Nature Reviews Immunology*, 7: 329-39.
- Lode, Holger N., Manuela Schmidt, Diana Seidel, Nicole Huebener, Diana Brackrock, Matthias Bleeke, Daniel Reker, Sven Brandt, Hans-Peter Mueller, Christiane Helm, and Nikolai Siebert. 2013. 'Vaccination with anti-idiotypic antibody ganglidiomab mediates a GD2-specific anti-neuroblastoma immune response', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62: 999-1010.
- Long, Adrienne H, Waleed M Haso, Jack F Shern, Kelsey M Wanhainen, Meera Murgai, Maria Ingaramo, Jillian P Smith, Alec J Walker, M Eric Kohler, and Vikas R Venkateshwara. 2015. '4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors', *Nature Medicine*, 21: 581-90.
- Long, Eric O. 1999. 'Regulation of immune responses through inhibitory receptors', *Annual review of immunology*, 17: 875-904.
- Long, Eric O., Hun Sik Kim, Dongfang Liu, Mary E. Peterson, and Sumati Rajagopalan. 2013. 'Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition', *Annual review of immunology*, 31: 227-58.
- Louis, Chrystal U., Barbara Savoldo, Gianpietro Dotti, Martin Pule, Eric Yvon, G. Doug Myers, Claudia Rossig, Heidi V. Russell, Oumar Diouf, Enli Liu, Hao Liu, Meng-Fen Wu, Adrian P. Gee, Zhuyong Mei, Cliona M. Rooney, Helen E. Heslop, and Malcolm K. Brenner. 2011. 'Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma', *Blood*, 118: 6050-56.
- Lozzio, CB, and BB Lozzio. 1975. 'Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome', *Blood*, 45: 321-34.
- Maher, John, Renier J. Brentjens, Gertrude Gunset, Isabelle Rivière, and Michel Sadelain. 2002. 'Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor', *Nature Biotechnology*, 20: 70-75.
- Maki, Guitta, Hans-G Klingemann, Jeffrey A Martinson, and Ying K Tam. 2001. 'Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92', *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10: 369-83.
- Malmberg, Karl-Johan, Mattias Carlsten, Andreas Björklund, Ebba Sohlberg, Yenan T. Bryceson, and Hans-Gustaf Ljunggren. 2017. 'Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer', *Seminars in Immunology*, 31: 20-29.
- Margolin, Kim A, Frederick R Aronson, Mario Sznol, Michael B Atkins, Nicolae Ciobanu, Richard I Fisher, Geoffrey R Weiss, James H Doroshow, Michael H Bar, and Michael J Hawkins. 1991. 'Phase II trial of high-dose interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma', *Journal of Immunotherapy: Official Journal of the Society for Biological Therapy*, 10: 214-20.
- Marofi, Farogh, Roza Motavalli, Vladimir A. Safonov, Lakshmi Thangavelu, Alexei Valerievich Yumashev, Markov Alexander, Navid Shomali, Max Stanley Chartrand, Yashwant Pathak, Mostafa Jarahian, Sepideh Izadi, Ali Hassanzadeh, Naghmeh Shirafkan, Safa Tahmasebi, and Farhad Motavalli Khiavi. 2021. 'CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities', *Stem Cell Research & Therapy*, 12: 81.

- Martín-Fontecha, Alfonso, Lindy L. Thomsen, Sara Brett, Craig Gerard, Martin Lipp, Antonio Lanzavecchia, and Federica Sallusto. 2004. 'Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming', *Nature immunology*, 5: 1260-65.
- Martinez, Marina, and Edmund Kyung Moon. 2019. 'CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment', *Frontiers in Immunology*, 10.
- McInnes, Iain B., Jamil Al-Mughales, Max Field, Bernard P. Leung, Fang-ping Huang, Richard Dixon, Roger D. Sturrock, Peter C. Wilkinson, and Foo Y. Liew. 1996. 'The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis', *Nature Medicine*, 2: 175-82.
- Medjouel Khelifi, Hakim, Sophie Guia, Eric Vivier, and Emilie Narni-Mancinelli. 2022. 'Role of the ITAM-bearing receptors expressed by Natural Killer cells in cancer', *Frontiers in Immunology*: 2256.
- Melaiu, Ombretta, Valeria Lucarini, Loredana Cifaldi, and Doriana Fruci. 2020. 'Influence of the tumor microenvironment on NK cell function in solid tumors', *Frontiers in Immunology*, 10: 3038.
- Mentlik, Ashley N, Keri B Sanborn, Erika L Holzbaur, and Jordan S Orange. 2010. 'Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment', *Molecular biology of the cell*, 21: 2241-56.
- Michaud, Annie, R'Kia Dardari, Emily Charrier, Paulo Cordeiro, Sabine Herblot, and Michel Duval. 2010. 'IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells', *Journal of immunotherapy*, 33: 382-90.
- Miller, Jeffrey S., Yvette Soignier, Angela Panoskaltsis-Mortari, Sarah A. McNearney, Gong H. Yun, Susan K. Fautsch, David McKenna, Chap Le, Todd E. Defor, Linda J. Burns, Paul J. Orchard, Bruce R. Blazar, John E. Wagner, Arne Slungaard, Daniel J. Weisdorf, Ian J. Okazaki, and Philip B. McGlave. 2005. 'Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer', *Blood*, 105: 3051-57.
- Mittal, Deepak, Matthew M. Gubin, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2014. 'New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape', *Current Opinion in Immunology*, 27: 16-25.
- Monclair, Tom, Garrett M Brodeur, Peter F Ambros, Hervé J Brisse, Giovanni Cecchetto, Keith Holmes, Michio Kaneko, Wendy B London, Katherine K Matthay, and Jed G Nuchtern. 2009. 'The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report', *Journal of Clinical Oncology*, 27: 298.
- Mond, James J, Andrew Lees, and Clifford M Snapper. 1995. 'T cell-independent antigens type 2', *Annual review of immunology*, 13: 655-92.
- Morgan, Doris Anne, Francis W Ruscetti, and Robert Gallo. 1976. 'Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows', *Science*, 193: 1007-08.
- Morris, E C, G M Bendle, and H J Stauss. 2003. 'Prospects for immunotherapy of malignant disease', *Clinical and Experimental Immunology*, 131: 1-7.
- Mortier, Erwan, Jérôme Bernard, Ariane Plet, and Yannick Jacques. 2004. 'Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor α -chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist', *The Journal of Immunology*, 173: 1681-88.

Mortier, Erwan, Agnès Quéméner, Patricia Vusio, Inken Lorenzen, Yvan Boublik, Joachim Grötzinger, Ariane Plet, and Yannick Jacques. 2006. 'Soluble interleukin-15 receptor α (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R β / γ : hyperagonist IL-15· IL-15R α fusion proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 1612-19.

Mosier, DE, and B Subbarao. 1982. 'Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed', *Immunology today*, 3: 217-22.

Mujoo, Kalpana, Thomas J. Kipps, Hsin Ming Yang, David A. Cheresch, Ursula Wargalla, Diana J. Sander, and Ralph A. Reisfeld. 1989. 'Functional Properties and Effect on Growth Suppression of Human Neuroblastoma Tumors by Isotype Switch Variants of Monoclonal Antiganglioside GD2 Antibody 14.181', *Cancer Research*, 49: 2857-61.

Munn, David H., and Vincenzo Bronte. 2016. 'Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment', *Current Opinion in Immunology*, 39: 1-6.

Navid, Fariba, V M Santana, and R C Barfield. 2010. 'Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors', *Current cancer drug targets*, 10: 200-09.

Nazha, Bassel, Cengiz Inal, and Taofeek K. Owonikoko. 2020. 'Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy', *Frontiers in Oncology*, 10.

Nelson, Brad H. 2004. 'IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance', *The Journal of Immunology*, 172: 3983-88.

Nguyen, Rosa, Xiyuan Zhang, Ming Sun, Shahroze Abbas, Charlie Seibert, Michael C. Kelly, Jack F. Shern, and Carol J. Thiele. 2022. 'Anti-GD2 Antibodies Conjugated to IL15 and IL21 Mediate Potent Antitumor Cytotoxicity against Neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 28: 3785-96.

Nowakowska, Paulina, Annette Romanski, Nicole Miller, Marcus Odendahl, Halvard Bonig, Congcong Zhang, Erhard Seifried, Winfried S. Wels, and Torsten Tonn. 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.

Oelsner, S., M. E. Friede, C. Zhang, J. Wagner, S. Badura, P. Bader, E. Ullrich, O. G. Ottmann, H. Klingemann, T. Tonn, and W. S. Wels. 2017. 'Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma', *Cytotherapy*, 19: 235-49.

Oelsner, Sarah, Anja Waldmann, Arne Billmeier, Jasmin Röder, Aline Lindner, Evelyn Ullrich, Rolf Marschalek, Gianpietro Dotti, Gundram Jung, Ludger Große-Hovest, Pranav Oberoi, Peter Bader, and Winfried S. Wels. 2019. 'Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth', *International Journal of Cancer*, 145: 1935-45.

Okawa, Sumiyo, and Kumiko Saika. 2022. 'International variations in neuroblastoma incidence in children and adolescents', *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 52: 656-58.

Omilusik, Kyla D, and Ananda W Goldrath. 2017. "The origins of memory T cells." In.: Nature Publishing Group.

Orange, Jordan S. 2008. 'Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse', *Nature Reviews Immunology*, 8: 713-25.

- Ormhøj, Maria, Hinrich Abken, and Sine R Hadrup. 2022. 'Engineering T-cells with chimeric antigen receptors to combat hematological cancers: an update on clinical trials', *Cancer Immunology, Immunotherapy*: 1-11.
- Orsi, G., M. Barbolini, G. Ficarra, G. Tazzioli, P. Manni, T. Petrachi, I. Mastrolia, E. Orvieto, C. Spano, M. Prapa, S. Kaleci, R. D'Amico, V. Guarneri, M. V. Dieci, S. Cascinu, P. Conte, F. Piacentini, and M. Dominici. 2017. 'GD2 expression in breast cancer', *Oncotarget*, 8: 31592-600.
- Paczulla, Anna M, Kathrin Rothfelder, Simon Raffel, Martina Konantz, Julia Steinbacher, Hui Wang, Claudia Tandler, Marcelle Mbarga, Thorsten Schaefer, and Mattia Falcone. 2019. 'Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion', *Nature*, 572: 254-59.
- Pancook, James D., Jürgen C. Becker, Stephen D. Gillies, and R. A. Reisfeld. 1996. 'Eradication of established hepatic human neuroblastoma metastases in mice with severe combined immunodeficiency by antibody-targeted interleukin-2', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 42: 88-92.
- Papadopoulos, Esperanza B, Marc Ladanyi, David Emanuel, Stephen Mackinnon, Farid Boulad, Matthew H Carabasi, Hugo Castro-Malaspina, Barrett H Childs, Alfred P Gillio, and Trudy N Small. 1994. 'Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation', *New England Journal of Medicine*, 330: 1185-91.
- Pegram, Hollie J, Daniel M Andrews, Mark J Smyth, Phillip K Darcy, and Michael H Kershaw. 2011. 'Activating and inhibitory receptors of natural killer cells', *Immunology & Cell Biology*, 89: 216-24.
- Peter, M. E., and P. H. Krammer. 2003. 'The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond', *Cell Death & Differentiation*, 10: 26-35.
- Pinto, N. R., M. A. Applebaum, S. L. Volchenboum, K. K. Matthay, W. B. London, P. F. Ambros, A. Nakagawara, F. Berthold, G. Schleiermacher, J. R. Park, D. Valteau-Couanet, A. D. Pearson, and S. L. Cohn. 2015. 'Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma', *J Clin Oncol*, 33: 3008-17.
- Poli, A., T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, and J. Zimmer. 2009. 'CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset', *Immunology*, 126: 458-65.
- Portoukalian, Jacques, Marie-Jeanne David, Michel Richard, and Philippe Gain. 1993. 'Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma', *International Journal of Cancer*, 53: 948-51.
- Prager, Isabel, and Carsten Watzl. 2019. 'Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity', *Journal of Leukocyte Biology*, 105: 1319-29.
- Purdy, Amanda K, and Kerry S Campbell. 2009. 'Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR)', *Cancer biology & therapy*, 8: 2209-18.
- Ragupathi, Govind, Nancy X Liu, Cristina Musselli, Shemeekah Powell, Kenneth Lloyd, and Philip O Livingston. 2005. 'Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity', *The Journal of Immunology*, 174: 5706-12.
- Raulet, David H., Stephan Gasser, Benjamin G. Gowen, Weiwen Deng, and Heiyoun Jung. 2013. 'Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor', *Annual review of immunology*, 31: 413-41.

- Raulet, David H., Russell E. Vance, and Christopher W. McMahon. 2001. 'Regulation of the Natural Killer Cell Receptor Repertoire', *Annual review of immunology*, 19: 291-330.
- Richards, Rebecca M., Elena Sotillo, and Robbie G. Majzner. 2018. 'CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma', *Frontiers in Immunology*, 9.
- Riedl, Stefan J., and Guy S. Salvesen. 2007. 'The apoptosome: signalling platform of cell death', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 405-13.
- Robertson, M. J., and J. Ritz. 1990. 'Biology and clinical relevance of human natural killer cells', *Blood*, 76: 2421-38.
- Rochman, Yrina, Rosanne Spolski, and Warren J Leonard. 2009. 'New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines', *Nature Reviews Immunology*, 9: 480-90.
- Romee, Rizwan, Sarah Cooley, Melissa M. Berrien-Elliott, Peter Westervelt, Michael R. Verneris, John E. Wagner, Daniel J. Weisdorf, Bruce R. Blazar, Celalettin Ustun, Todd E. DeFor, Sithara Vivek, Lindsey Peck, John F. DiPersio, Amanda F. Cashen, Rachel Kylo, Amy Musiek, András Schaffer, Milan J. Anadkat, Ilana Rosman, Daniel Miller, Jack O. Egan, Emily K. Jeng, Amy Rock, Hing C. Wong, Todd A. Fehniger, and Jeffrey S. Miller. 2018. 'First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation', *Blood*, 131: 2515-27.
- Romee, Rizwan, Jeffrey W. Leong, and Todd A. Fehniger. 2014. 'Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer', *Scientifica*, 2014: 205796.
- Rooney, Cliona M., Colton A. Smith, Catherine Y.C. Ng, Susan K. Loftin, John W. Sixbey, Yanjun Gan, Deo-Kumar Srivastava, Laura C. Bowman, Robert A. Krance, Malcolm K. Brenner, and Helen E. Heslop. 1998. 'Infusion of Cytotoxic T Cells for the Prevention and Treatment of Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoma in Allogeneic Transplant Recipients', *Blood*, 92: 1549-55.
- Rosen, David B, Manabu Araki, Jessica A Hamerman, Taian Chen, Takashi Yamamura, and Lewis L Lanier. 2004. 'A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D', *The Journal of Immunology*, 173: 2470-78.
- Rosenbaum, E., R. Chugh, C. W. Ryan, M. Agulnik, M. M. Milhem, S. George, R. L. Jones, B. Chmielowski, B. A. Van Tine, H. Tawbi, A. D. Elias, W. L. Read, G. T. Budd, L. X. Qin, E. T. Rodler, J. Hirman, P. Weiden, C. M. Bennett, P. O. Livingston, G. Ragupathi, D. Hansen, S. P. D'Angelo, W. D. Tap, G. K. Schwartz, R. G. Maki, and R. D. Carvajal. 2022. 'A randomised phase II trial of a trivalent ganglioside vaccine targeting GM2, GD2 and GD3 combined with immunological adjuvant OPT-821 versus OPT-821 alone in metastatic sarcoma patients rendered disease-free by surgery', *Eur J Cancer*, 176: 155-63.
- Rosenberg, Jillian, and Jun Huang. 2018. 'CD8+ T cells and NK cells: parallel and complementary soldiers of immunotherapy', *Current Opinion in Chemical Engineering*, 19: 9-20.
- Rosenberg, Steven. 1985. 'Lymphokine-activated killer cells: A new approach to immunotherapy of cancer', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 75: 595-603.
- Rosenberg, Steven A. 1999. 'A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens', *Immunity*, 10: 281-87.
- Rosenberg, Steven A, James C Yang, Suzanne L Topalian, Douglas J Schwartzentruber, Jeffrey S Weber, David R Parkinson, Claudia A Seipp, Jan H Einhorn, and Donald E White. 1994. 'Treatment of

283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2', *Jama*, 271: 907-13.

Ruchatz, Holger, Bernard P Leung, Xiao-qing Wei, Iain B McInnes, and Foo Y Liew. 1998. 'Soluble IL-15 receptor α -chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology', *The Journal of Immunology*, 160: 5654-60.

Ruggeri, Loredana, Marusca Capanni, Elena Urbani, Katia Perruccio, Warren D. Shlomchik, Antonella Tosti, Sabrina Posati, Daniela Rogaia, Francesco Frassoni, Franco Aversa, Massimo F. Martelli, and Andrea Velardi. 2002. 'Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants', *Science*, 295: 2097-100.

Sadelain, Michel, Renier Brentjens, and Isabelle Rivière. 2013. 'The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design', *Cancer Discovery*, 3: 388-98.

Sahm, Christiane, Kurt Schönfeld, and Winfried S Wels. 2012. 'Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61: 1451-61.

Sakaguchi, S, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh, and M Toda. 1995. 'Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases', *The Journal of Immunology*, 155: 1151-64.

Sallusto, Federica, Jens Geginat, and Antonio Lanzavecchia. 2004. 'Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance', *Annual review of immunology*, 22: 745.

Savoldo, Barbara, Carlos Almeida Ramos, Enli Liu, Martha P Mims, Michael J Keating, George Carrum, Rammurti T Kamble, Catherine M Bollard, Adrian P Gee, and Zhuyong Mei. 2011. 'CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor–modified T cells in lymphoma patients', *The Journal of clinical investigation*, 121: 1822-26.

Schnaar, Ronald L, Akemi Suzuki, and Pamela Stanley. 2009. 'Glycosphingolipids', *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*.

Schneider, Dina, Ying Xiong, Darong Wu, Volker Nölle, Sarah Schmitz, Waleed Haso, Andrew Kaiser, Boro Dropulic, and Rimas J. Orentas. 2017. 'A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5: 42.

Schönfeld, Kurt, Christiane Sahm, Congcong Zhang, Sonja Naundorf, Christian Brendel, Marcus Odendahl, Paulina Nowakowska, Halvard Bönig, Ulrike Köhl, and Stephan Kloess. 2015. 'Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor', *Molecular therapy*, 23: 330-38.

Schroeder Jr, Harry W, and Lisa Cavacini. 2010. 'Structure and function of immunoglobulins', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S41-S52.

Schwartz, Rowena N, Lori Stover, and Janice P Dutcher. 2002. 'Managing toxicities of high-dose interleukin-2', *Oncology (Williston Park, NY)*, 16: 11-20.

- Seeger, Robert C., Garrett M. Brodeur, Harland Sather, Andree Dalton, Stuart E. Siegel, Kwan Y. Wong, and Denman Hammond. 1985. 'Association of Multiple Copies of the N-myc Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas', *New England Journal of Medicine*, 313: 1111-16.
- Seidel, D., A. Shibina, N. Siebert, W. S. Wels, C. P. Reynolds, N. Huebener, and H. N. Lode. 2015. 'Disialoganglioside-specific human natural killer cells are effective against drug-resistant neuroblastoma', *Cancer Immunol Immunother*, 64: 621-34.
- Semeraro, Michaela, Sylvie Rusakiewicz, Véronique Minard-Colin, Nicolas F Delahaye, David Enot, Frédéric Vély, Aurélien Marabelle, Benjamin Papoular, Christelle Piperoglou, and Mirco Ponzoni. 2015a. 'Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients', *Science translational medicine*, 7: 283ra55-83ra55.
- Semeraro, Michaela, Sylvie Rusakiewicz, Laurence Zitvogel, and Guido Kroemer. 2015b. 'Natural killer cell mediated immunosurveillance of pediatric neuroblastoma', *OncolImmunology*, 4: e1042202.
- Setoguchi , Ruka, Shohei Hori , Takeshi Takahashi , and Shimon Sakaguchi 2005. 'Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization', *Journal of Experimental Medicine*, 201: 723-35.
- Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2001. 'IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity', *Nature*, 410: 1107-11.
- Shiku, H, T Takahashi, and H F Oettgen. 1976. 'Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens', *Journal of Experimental Medicine*, 144: 873-81.
- Shimasaki, Noriko, Amit Jain, and Dario Campana. 2020. 'NK cells for cancer immunotherapy', *Nature Reviews Drug Discovery*, 19: 200-18.
- Shuh, Maureen, Humberto Bohorquez, George E. Loss, and Ari J. Cohen. 2013. 'Tumor Necrosis Factor- α : Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury', *Ochsner Journal*, 13: 119-30.
- Shultz, L D, P A Schweitzer, S W Christianson, B Gott, I B Schweitzer, B Tennent, S McKenna, L Mobraaten, T V Rajan, and D L Greiner. 1995. 'Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice', *The Journal of Immunology*, 154: 180-91.
- Shusterman, Suzanne, Wendy B London, Stephen D Gillies, Jacquelyn A Hank, Stephan D Voss, Robert C Seeger, C Patrick Reynolds, Jennifer Kimball, Mark R Albertini, and Barrett Wagner. 2010. 'Antitumor activity of hu14. 18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study', *Journal of Clinical Oncology*, 28: 4969.
- Shusterman, Suzanne, Arlene Naranjo, Collin Van Ryn, Jaquelyn A. Hank, Marguerite T. Parisi, Barry L. Shulkin, Sabah Servaes, Wendy B. London, Hiroyuki Shimada, Jacek Gan, Steven D. Gillies, John M. Maris, Julie R. Park, and Paul M. Sondel. 2019. 'Antitumor Activity and Tolerability of hu14.18-IL2 with GM-CSF and Isotretinoin in Recurrent or Refractory Neuroblastoma: A Children's Oncology Group Phase II Study', *Clinical Cancer Research*, 25: 6044-51.
- Sivori, Simona, Paola Vacca, Genny Del Zotto, Enrico Munari, Maria Cristina Mingari, and Lorenzo Moretta. 2019. 'Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications', *Cellular & Molecular Immunology*, 16: 430-41.

- Smith, Logan K, Giselle M Boukhaled, Stephanie A Condotta, Sabrina Mazouz, Jenna J Guthmiller, Rahul Vijay, Noah S Butler, Julie Bruneau, Naglaa H Shoukry, and Connie M Krawczyk. 2018. 'Interleukin-10 directly inhibits CD8+ T cell function by enhancing N-glycan branching to decrease antigen sensitivity', *Immunity*, 48: 299-312. e5.
- Smith, Valeria, and Jennifer Foster. 2018. 'High-Risk Neuroblastoma Treatment Review', *Children*, 5: 114.
- Spanholtz, Jan, Marleen Tordoir, Diana Eissens, Frank Preijers, Arnold van der Meer, Irma Joosten, Nicolaas Schaap, Theo M de Witte, and Harry Dolstra. 2010. 'High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy', *PLoS one*, 5: e9221.
- Statistisches Bundesamt. 2020. 'Pressemitteilung Nr. 505 vom 4. November 2021'. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21_505_23211.html [Stand: 09.11.2022, 17 Uhr].
- Stauber, Deborah J., Erik W. Debler, Patricia A. Horton, Kendall A. Smith, and Ian A. Wilson. 2006. 'Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 2788-93.
- Stonier, Spencer W., and Kimberly S. Schluns. 2010. 'Trans-presentation: A novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses', *Immunology Letters*, 127: 85-92.
- Street, Shayna E.A., Yoshihiro Hayakawa, Yifan Zhan, Andrew M. Lew, Duncan MacGregor, Amanda M. Jamieson, Andreas Diefenbach, Hideo Yagita, Dale I. Godfrey, and Mark J. Smyth. 2004. 'Innate Immune Surveillance of Spontaneous B Cell Lymphomas by Natural Killer Cells and $\gamma\delta$ T Cells', *Journal of Experimental Medicine*, 199: 879-84.
- Sutlu, T., S. Nystrom, M. Gilljam, B. Stellan, S. E. Applequist, and E. Alici. 2012. 'Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy', *Hum Gene Ther*, 23: 1090-100.
- Tassi, Ilaria, Julia Klesney-Tait, and Marco Colonna. 2006. 'Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse', *Immunological Reviews*, 214: 92-105.
- Tay, Matthew Zirui, Kevin Wiehe, and Justin Pollara. 2019. 'Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses', *Frontiers in Immunology*, 10.
- Thomas, L. 1959. 'Discussion', *H.S. Lawrence (Ed.), Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, Hoeber-Harper, New York: 529-32.
- Tinhofer, Inge, Ingrid Marschitz, Traudl Henn, Alexander Egle, and Richard Greil. 2000. 'Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma', *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95: 610-18.
- Tonn, Torsten, Sven Becker, Ruth Esser, Dirk Schwabe, and Erhard Seifried. 2001. 'Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92', *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10: 535-44.

- Tonn, Torsten, Dirk Schwabe, Hans G. Klingemann, Sven Becker, Ruth Esser, Ulrike Koehl, Meinolf Suttorp, Erhard Seifried, Oliver G. Ottmann, and Gesine Bug. 2013. 'Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92', *Cytotherapy*, 15: 1563-70.
- Uherek, Christoph, Bernd Groner, and Winfried Wels. 2001. 'Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells', *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10: 523-34.
- Valentijn, Linda J, Jan Koster, Danny A Zwijnenburg, Nancy E Hasselt, Peter Van Sluis, Richard Volckmann, Max M Van Noesel, Rani E George, Godelieve AM Tytgat, and Jan J Molenaar. 2015. 'TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors', *Nature genetics*, 47: 1411-14.
- Valentino, LA, and S Ladisch. 1994. 'Circulating tumor gangliosides enhance platelet activation', *Blood*, 83: 2872-77.
- Vallera, Daniel A., Soldano Ferrone, Behiye Kodal, Peter Hinderlie, Laura Bendzick, Brianna Ettestad, Caroline Hallstrom, Nicholas A. Zorko, Arpit Rao, Naomi Fujioka, Charles J. Ryan, Melissa A. Geller, Jeffrey S. Miller, and Martin Felices. 2020. 'NK-Cell-Mediated Targeting of Various Solid Tumors Using a B7-H3 Tri-Specific Killer Engager In Vitro and In Vivo', *Cancers*, 12: 2659.
- Van der Meer, JMR, RJA Maas, Karolin Guldevall, K Klarenaar, PKJD de Jonge, JS Evert, AB van der Waart, J Cany, JT Safrit, and JH Lee. 2021. 'IL-15 superagonist N-803 improves IFN γ production and killing of leukemia and ovarian cancer cells by CD34+ progenitor-derived NK cells', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70: 1305-21.
- Vey, N., L. Karlin, S. Sadot-Lebouvier, F. Broussais, D. Berton-Rigaud, J. Rey, A. Charbonnier, D. Marie, P. André, C. Paturel, R. Zerbib, J. Bennouna, G. Salles, and A. Gonçalves. 2018. 'A phase 1 study of lirilumab (antibody against killer immunoglobulin-like receptor antibody KIR2D; IPH2102) in patients with solid tumors and hematologic malignancies', *Oncotarget*, 9: 17675-88.
- Vincent, Marie, Agnès Quéméner, and Yannick Jacques. 2013. 'Antitumor activity of an immunocytokine composed of an anti-GD2 antibody and the IL-15 superagonist RLI', *Oncolmmunology*, 2: e26441.
- Vivier, Eric, Sophie Ugolini, Didier Blaise, Christian Chabannon, and Laurent Brossay. 2012. 'Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer', *Nature Reviews Immunology*, 12: 239-52.
- Vogelstein, Bert, and Kenneth W. Kinzler. 2004. 'Cancer genes and the pathways they control', *Nature Medicine*, 10: 789-99.
- von Karstedt, Silvia, Antonella Montinaro, and Henning Walczak. 2017. 'Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy', *Nature Reviews Cancer*, 17: 352-66.
- Wagner, Julia A, Maximillian Rosario, Rizwan Romee, Melissa M Berrien-Elliott, Stephanie E Schneider, Jeffrey W Leong, Ryan P Sullivan, Brea A Jewell, Michelle Becker-Hapak, and Timothy Schappe. 2017. 'CD56 bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming', *The Journal of clinical investigation*, 127: 4042-58.
- Waldmann, Thomas A. 2003. 'A novel means of favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells', *Immunity*, 19: 465-66.
- Waldmann, Thomas A., Enrico Lugli, Mario Roederer, Liyanage P. Perera, Jeremy V. Smedley, Rhonda P. Macallister, Carolyn K. Goldman, Bonita R. Bryant, Jean M. Decker, Thomas A. Fleisher, H. Clifford

- Lane, Michael C. Sneller, Roger J. Kurlander, David E. Kleiner, John M. Pletcher, William D. Figg, Jason L. Yovandich, and Stephen P. Creekmore. 2011. 'Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques', *Blood*, 117: 4787-95.
- Waldmann, Thomas, Yutaka Tagaya, and Richard Bamford. 1998. 'Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Receptors', *International Reviews of Immunology*, 16: 205-26.
- Walzer, Thierry, Marc Dalod, Scott H. Robbins, Laurence Zitvogel, and Eric Vivier. 2005. 'Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"', *Blood*, 106: 2252-58.
- Warlick, Erica D., Daniel J. Weisdorf, Daniel A. Vallera, Rose Wangen, Dixie Lewis, JoAnn Knox, Martin Schroeder, Martin Felices, and Jeffrey S. Miller. 2020. 'GTB-3550 TriKE™ for the Treatment of High-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML) Safely Drives Natural Killer (NK) Cell Proliferation At Initial Dose Cohorts', *Blood*, 136: 7-8.
- Weinberg, R.A. 2013. *The Biology of Cancer* (W.W. Norton).
- Wieczorek, Aleksandra, Carla Manzitti, Alberto Garaventa, Juliet Gray, Vassilios Papadakis, Dominique Valteau-Couanet, Katarzyna Zachwieja, Ulrike Poetschger, Ingrid Pribill, Stefan Fiedler, Ruth Ladenstein, and Holger N. Lode. 2022. 'Clinical Phenotype and Management of Severe Neurotoxicity Observed in Patients with Neuroblastoma Treated with Dinutuximab Beta in Clinical Trials', *Cancers*, 14: 1919.
- Wondimu, Assefa, Tianqian Zhang, Thomas Kieber-Emmons, Phyllis Gimotty, Katrin Sproesser, Rajasekharan Somasundaram, Soldano Ferrone, Chun-Yen Tsao, and Dorothee Herlyn. 2008. 'Peptides mimicking GD2 ganglioside elicit cellular, humoral and tumor-protective immune responses in mice', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57: 1079-89.
- Wu, Zi-Liang, Stephan Ladisch, Stephen Feig, Lisa Ulsh, Eileen Schwartz, Grace Floutsis, Frances Wiley, Carl Lenarsky, and Robert Seeger. 1987. 'Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma', *International Journal of Cancer*, 39: 73-76.
- Wu, Zi-Liang, Eileen Schwartz, Robert Seeger, and Stephan Ladisch. 1986. 'Expression of GD2 Ganglioside by Untreated Primary Human Neuroblastomas', *Cancer Research*, 46: 440-43.
- Xu, Xin, Wei Huang, Andras Heczey, Daofeng Liu, Linjie Guo, Michael Wood, Jingling Jin, Amy N. Courtney, Bin Liu, Erica J. Di Pierro, John Hicks, Gabriel A. Barragan, Ho Ngai, Yuhui Chen, Barbara Savoldo, Gianpietro Dotti, and Leonid S. Metelitsa. 2019. 'NKT Cells Coexpressing a GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and IL15 Show Enhanced In Vivo Persistence and Antitumor Activity against Neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 25: 7126-38.
- Yajima, Toshiki, Kazufumi Yoshihara, Kenji Nakazato, Shino Kumabe, Shigeo Koyasu, Subash Sad, Hao Shen, Hiroyuki Kuwano, and Yasunobu Yoshikai. 2006. 'IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection', *The Journal of Immunology*, 176: 507-15.
- Yu, A. L., A. L. Gilman, M. F. Ozkaynak, W. B. London, S. G. Kreissman, H. X. Chen, M. Smith, B. Anderson, J. G. Villablanca, K. K. Matthay, H. Shimada, S. A. Grupp, R. Seeger, C. P. Reynolds, A. Buxton, R. A. Reisfeld, S. D. Gillies, S. L. Cohn, J. M. Maris, and P. M. Sondel. 2010. 'Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma', *N Engl J Med*, 363: 1324-34.
- Yu, Alice L, Andrew L Gilman, M Fevzi Ozkaynak, Arlene Naranjo, Mitchell B Diccianni, Jacek Gan, Jacquelyn A Hank, Ayse Batova, Wendy B London, and Sheena C Tenney. 2021. 'Long-Term Follow-up

of a Phase III Study of ch14. 18 (Dinutuximab)+ Cytokine Immunotherapy in Children with High-Risk Neuroblastoma: COG Study ANBL0032 Long-Term Follow-up of Immunotherapy for Neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 27: 2179-89.

Yu, Jianhua, Aharon G. Freud, and Michael A. Caligiuri. 2013. 'Location and cellular stages of natural killer cell development', *Trends in Immunology*, 34: 573-82.

Zeng, Yan, Stefan Fest, Renate Kunert, Hermann Katinger, Vito Pistoia, Jean Michon, Gillan Lewis, Ruth Ladenstein, and Holger N. Lode. 2005. 'Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice', *Molecular Immunology*, 42: 1311-19.

Zhang, Congcong, Pranav Oberoi, Sarah Oelsner, Anja Waldmann, Aline Lindner, Torsten Tonn, and Winfried S. Wels. 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, Congcong, Jasmin Röder, Anne Scherer, Malena Bodden, Jordi Pfeifer Serrahima, Anita Bhatti, Anja Waldmann, Nina Müller, Pranav Oberoi, and Winfried S Wels. 2021. 'Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9: e002980.

Zhou, Yang, Tiffany Husman, Xinjian Cen, Tasha Tsao, James Brown, Aarushi Bajpai, Miao Li, Kuangyi Zhou, and Lili Yang. 2022. 'Interleukin 15 in cell-based cancer immunotherapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 7311.

Zhu, X., W. D. Marcus, W. Xu, H. I. Lee, K. Han, J. O. Egan, J. L. Yovandich, P. R. Rhode, and H. C. Wong. 2009. 'Novel human interleukin-15 agonists', *J Immunol*, 183: 3598-607.

Zingoni, Alessandra, Elisabetta Vulpis, Ilaria Nardone, Alessandra Soriani, Cinzia Fionda, Marco Cippitelli, and Angela Santoni. 2016. 'Targeting NKG2D and NKp30 Ligands Shedding to Improve NK Cell-Based Immunotherapy', 36: 445-60.

Zinkernagel, Rol M., and Pete C. Doherty. 1979. 'MHC-Restricted Cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T-Cell Restriction-Specificity, Function, and Responsiveness.' in Henry G. Kunkel and Frank J. Dixon (eds.), *Advances in immunology* (Academic Press).

Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, and D. Trono. 1997. 'Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo', *Nat Biotechnol*, 15: 871-5.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	eGFP	<i>Enhanced GFP</i>
Abb.	Abbildung	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>	EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ADCP	<i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AF	Alexa Fluor	E:T	<i>Effector:Target</i>
AICD	<i>Activation induced cell death</i>	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie	Fas-L	Fas-Ligand
AML	akuten myeloischen Leukämie	FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
APC	Allophycocyanin	FcR γ	Fc-Rezeptor γ
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
BCSC	<i>Breast cancer stem-like cells</i>	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
BLI	<i>Bioluminescence imaging</i>	g	Erdbeschleunigung
bp	Basenpaar	G418	Geneticin
BSA	Bovines Serumalbumin	yc	<i>Common gamma chain</i>
BV	Brilliant™ Violet	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>	GLR	gemischte Lymphozytenreaktion
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>	GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
CDR	<i>Complementarity-determining region</i>	G γ	Gray
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester	h	Stunde
C _H	<i>Constant heavy chain</i>	HE	Hämatoxylin/Eosin
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>	HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
C _L	<i>Constant light chain</i>	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
CLL	<i>Chronic lymphocytic leukemia</i>	huIL-15	humanes IL-15
CMV	Cytomegalievirus	iCas9	<i>Inducible caspase-9</i>
CR	<i>Complete response</i>	IFN γ	Interferon- γ
CRS	<i>Cytokine release syndrome</i>	Ig	Immunglobulin
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>	IL	Interleukin
CV	Calcein Violet AM	IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
Cy7	Cyanin-7	iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>	IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	IU	<i>International unit</i>
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat	i.v.	intravenös
DRK	Deutsches Rotes Kreuz	Jak	Janus Kinase
EBV	Epstein Barr Virus	kb	Kilobase
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>	K _D	Dissoziationskonstante
E. coli	Escherichia coli	kDa	Kilo-Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EFS	<i>Event-free survival</i>		

Abkürzungsverzeichnis

KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>	SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>	SD	<i>Standard deviation</i>
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle	SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
LB	Luria Burtani	SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
mA	Milliampère	SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>	sfGFP	<i>Superfolder GFP</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>	SP	<i>Signalpeptid</i>
mg	Milligramm	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
µg	Mikrogramm	TAA	<i>Tumorassoziertes Antigen</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	TAE	<i>Tris -Acetat-EDTA</i>
MICA/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>	TAMs	<i>Tumor associated macrophages</i>
min	Minute	TBS-T	<i>Tris-buffered saline-TWEEN 20</i>
ml	Milliliter	T _{CM}	<i>Central memory T cell</i>
µl	Mikroliter	TCR	<i>T cell receptor</i>
µm	Mikrometer	T _{EFF}	<i>Effector T cell</i>
MRD	<i>Minimal residual disease</i>	T _{EM}	<i>Effector memory T cell</i>
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>	TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
ng	Nanogramm	TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
NK	Natürliche Killerzelle	T _H	<i>Hybridisierungstemperatur</i>
NKG2A	<i>Natural killer group 2A</i>	TIGIT	<i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
NKG2D	<i>Natural killer group 2D</i>	TIM-3	<i>T cell immunoglobulin-3</i>
NSG	<i>NOD-SCID common gamma chain</i>	TM	<i>Transmembran</i>
ORR	<i>Overall remission rate</i>	TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>
OS	<i>Overall survival</i>	T _N	<i>Naive T cell</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>	TNFα	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>	Treg	<i>regulatory T cell</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>	TRUCK	<i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i>
PE	Phycoerythrin	TSA	<i>Tumorspezifisches Antigen</i>
PEI	Polyethylenimin	U	<i>Unit</i>
PI	Propidiumiodid	ULBP	<i>UL-16 Binding Protein</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	V	<i>Volt</i>
PR	<i>Partial response</i>	v/v	<i>volume/volume percent</i>
pSTAT	Phospho-STAT	V _H	<i>variable heavy chain</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid	V _L	<i>variable light chain</i>
Rα	Rezeptor-α	VSV-G	<i>Vesicular Stomatitis Virus protein-G</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>	w/v	<i>weight/volume percent</i>
<i>rpm</i>	<i>Rounds per minute</i>	z.B.	<i>zum Beispiel</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
s.c.	subkutan		
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>		

Publikationen

Veröffentlichungen

Pfeifer Serrahima, Jordi, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Malena Bodden, Jasmin Röder, Claudia Arndt, Anja Feldmann, Anne Kiefer, Maren Prüfer, Ines Kühnel, Torsten Tonn, Michael Bachmann, and Winfried S. Wels. 2023. 'Multivalent adaptor proteins specifically target NK cells carrying a universal chimeric antigen receptor to ErbB2 (HER2)-expressing cancers', *Cancer Immunology, Immunotherapy*.

Zhang, Congcong, Jasmin Röder, Anne Scherer, Malena Bodden, Jordi Pfeifer Serrahima, Anita Bhatti, Anja Waldmann, Nina Müller, Pranav Oberoi, and Winfried S Wels. 2021. 'Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9: e002980.

Ausgewählte Posterpräsentationen

Anne Scherer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)

“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity”

UCT Science Day, Frankfurt

Anne Scherer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)

“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity”

19th Meeting of the Society for Natural Immunity, Bonita Springs, USA

Jordi Pfeifer Serrahima, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Malena Bodden, Jasmin Röder, Claudia Arndt, Torsten Tonn, Michael Bachmann, Winfried S. Wels (2021)

„Multivalent adaptor proteins for specific targeting of off-the-shelf UniCAR NK Cells to ErbB2 (HER2)-expressing cancers“

13th PEGS Europe, Barcelona, ESP

Malena Bodden, Aline Lindner, Evelyn Ullrich, Pranav Oberoi, Winfried S. Wels (2019)

“Co-expression of IL-15 superagonist facilitates self-enrichment of GD₂-specific CAR-NK cells and mediates potent cell killing in the absence of IL-2”

18th Meeting of the Society for Natural Immunity, Luxemburg

Danksagung

Lebenslauf