

Aus der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**Etablierung einer in vitro Screeningplattform für
individualisiertes Immuntargeting (SPIIT) solider Tumoren**

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

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

Vorgelegt von

Schröder, Sarah Marena

2020

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2020

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. J. Lang
2. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. J. Walz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Formelverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom als relevanter Vertreter solider Tumoren	1
1.2 Bisherige Therapie solider Tumoren und neuere Forschungsfelder.....	2
1.3 T-Zell basierte Immuntherapie	4
1.4 Chimäre Antigenrezeptor exprimierende T-Zellen.....	5
1.5 Bisheriger Einsatz und Limitation der CAR-T-Zell Therapie	7
1.6 AdCAR-T-Zellen.....	9
1.7 Screening Plattform für individuelles Immuntargeting solider Tumoren	11
1.8 Plan und Hypothese der Arbeit	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Allgemeine Materialien und Geräte.....	13
2.1.1 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.2 Zellkulturmedien und -zusätze.....	14
2.1.3 Stammlösungen	14
2.1.4 Flüssigkeiten und Chemikalien.....	16
2.1.5 Verwendete Geräte.....	17
2.1.6 Verwendete Zentrifugenprogramme und -einstellungen	18
2.1.7 Software	19

Inhaltsverzeichnis

2.2	Spezielle Materialien.....	20
2.3	Antikörper	21
2.4	Humanes Zellmaterial.....	22
2.4.1	Primärzellkultur aus einer Metastase	23
2.5	Herstellung lentiviraler Vektoren	24
2.6	Kultivierung der Tumorzelllinien	24
2.7	Transduktion der Karzinomzelllinien	25
2.8	Durchflusszytometrie	25
2.8.1	Funktionsweise eines Durchflusszytometers	25
2.8.2	Auswertung durchflusszytometrischer Daten.....	27
2.8.3	Transduktionskontrolle der Tumorzelllinien	29
2.8.4	Antigenscreening der Tumorzelllinien	29
2.9	CAR-T-Zell Herstellung.....	30
2.9.1	T-Zell Isolierung aus dem Vollblut gesunder Spender.....	30
2.9.2	T-Zell Anreicherung durch Magnetaktivierte Zellsortierung (MACS) ..	30
2.9.3	T-Zell Transduktion und Expansion.....	31
2.9.4	Ermittlung der Transduktionseffizienz	31
2.10	Zytotoxizitätsversuche.....	32
2.10.1	Normalisierung der Effektorzellen.....	32
2.10.2	Versuchsaufbau und Prinzip der Zytotoxizitätsversuche	33
2.10.3	Biolumineszenz-basierte Methode.....	34
2.10.4	Auswertung der Biolumineszenz-basierten Methode.....	35
2.10.5	Zelladhärenz basierte Methode.....	36
2.10.6	Auswertung der Zelladhärenz basierten Methode	37

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	38
3.1	Ergebnisse der Herstellung Luciferase exprimierender Zelllinien	38
3.2	Immunphänotypisierung und Antigenscreening der Tumorzellen	40
3.3	Charakterisierung des CAR-T-Zell Produkts	42
3.4	Ausschluss unspezifischer Effekte durch Adapter und MOCK-T-Zellen ...	44
3.5	Vergleich der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methode	45
3.6	Spezifische Lyse der Tumorzellen durch AdCAR-T-Zellen	48
3.7	Korrelation zwischen AG-Expression und spezifischer Lyse	54
4	Diskussion	57
4.1	Bedarf neuer Therapien	57
4.2	Verwendeten Ziel-AG und potentielle Toxizitäten	57
4.3	Das AdCAR System als Lösungsansatz	61
4.3.1	Der Einfluss eines AdCAR Systems auf die Sicherheit	61
4.3.2	Der Einfluss eines AdCAR Systems auf die Effektivität	62
4.4	Antigenscreening	63
4.4.1	Bedeutung des AG Screenings für die AdCAR Therapie	63
4.4.2	Vorhersage zur Spezifität des AdCAR Systems	66
4.4.3	Vorhersage zur Korrelation zwischen Antigenexpression und Lyse ...	67
4.4.4	Weitere, die Lyse beeinflussende Faktoren	68
4.4.5	Potenzielle Bedeutung für den klinischen Einsatz	68
4.5	Diskussion der funktionellen Testung	69
4.5.1	Optimierung der Zytotoxizitätsversuche	69
4.5.2	Stellenwert der funktionellen Testung	70
4.5.3	Stärken der SPIIT	71

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung	72
6	Anhang	73
6.1	Protokolle	73
6.1.1	Virusherstellung	73
6.1.2	Kultivierung der Tumorzelllinien	74
6.1.3	Antigenscreening der Brustkrebszelllinien, Sekundärfärbung.....	75
6.2	AdCAR-T-Zell Expansion	77
7	Literaturverzeichnis	81
8	Erklärung zum Eigenanteil	87
9	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Chimären Antigenrezeptors (CAR) der zweiten Generation	6
Abbildung 2: Indirekte Erkennung des Zielantigens durch einen AdCAR mittels Biotinadapter.....	10
Abbildung 3: Prinzip der Auswertung durchflusszytometrischer Messungen	28
Abbildung 4: Auswertung des Transduktionserfolges.....	32
Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der Luciferase basierten AdCAR-T-Zell Versuche.....	35
Abbildung 6: Nachweis der Luciferaseexpression der transduzierten Zelllinien	39
Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse des Antigenscreening der Brustkrebszelllinien als Heatmap.....	41
Abbildung 8: Minimaler und maximaler Transduktionserfolg der zwei verwendeten Viruschargen.....	42
Abbildung 9: Ad-CAR-T Zell Anteil vor und nach MACS	43
Abbildung 10: Adaptermoleküle und MOCK-T-Zellen verursachen bei Brustkrebszellen keine Lyse	44
Abbildung 11: Vergleich der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden ...	48
Abbildung 12: MDA-MB-468; Vergleich der spezifischen Lyse und AG-Expression	50
Abbildung 13: MC-1; Vergleich der spezifischen Lyse und AG-Expression	51
Abbildung 14: Vergleich zwischen der spezifischen Lyse und der Antigenexpression (overton)	52
Abbildung 15: Vergleich zwischen der spezifischen Lyse und der Antigenexpression (MFIR)	53
Abbildung 16: Korrelation zwischen der spezifischen Lyse und der AG-Expression	55
Abbildung 17: Korrelation zwischen der spezifischen Lyse und der MFIR	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 2: Zellkulturmedien und -zusätze	14
Tabelle 3: Flüssigkeiten und Chemikalien	16
Tabelle 4: Verwendete Geräte	17
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zentrifugenprogramme	18
Tabelle 6: Verwendete Software	19
Tabelle 7: Spezielle Materialien	20
Tabelle 8: Liste der für das Antigenscreening verwendeten AK	21
Tabelle 9: Liste der für die Effektoren verwendeten AK	21
Tabelle 10: Übersicht über das verwendete, humane Zellmaterial	22
Tabelle 11: Klassifizierung der kommerziellen Brustkrebszelllinien	22
Tabelle 12: Kultivierung der Tumorzelllinien	25
Tabelle 13: Verwendete Fluorochrome und Zytometereinstellungen	27
Tabelle 14: Messergebnisse zu Abbildung 6	39
Tabelle 15: Statistische Auswertung des Vergleichs der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden	46

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der spezifischen Lyse anhand der Viabilitätswerte	34
Formel 2: Berechnung der Zellzahl.....	75

Abkürzungsverzeichnis

(P/S)	Penicillin/Streptomycin
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	<i>Adenosin Triphosphat</i>
BUV	Brilliant ultraviolet
bzw.	Beziehungsweise
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.T	<i>Effektor zu Target</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter
G	Gauge
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h.i.	Hitzeinaktiviert
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
L-Glut	L-Glutamin, L-Glutamin
LNGFR	Low-affinity nerve growth factor receptor
LUC	Luciferase
MB	Microbeads
MFIR	Mediane Fluoreszenzintensitäts Ratio
mM	Millimolar
MSL/CL	<i>Siehe Mesenchymal stemlike/ Claudin low</i>

Abkürzungsverzeichnis

PBS.....	Phosphate buffered saline
Pol.....	DNA Polymerase
Pr.....	Programm
REA.....	Recombinant engineered antibodies
Rev.....	Reverse Transkriptase
RTCA.....	<i>Real time cytotoxicity assay</i>
SSC.....	Sidewardscatter
Tat.....	Transaktivatorprotein
VSV-G.....	Vesicular stomatitis virus Glykoprotein
ZKM.....	Zellkulturmedium

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom als relevanter Vertreter solider Tumoren

Krebserkrankungen stellen in Deutschland, nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar. Mit einem Anteil von 30 % stellt das Mammakarzinom das häufigste Malignom der Frau dar. Jede zehnte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [1].

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 83 % [2]. Dennoch stellt das Mammakarzinom aufgrund seiner hohen Inzidenz, nach dem Lungenkarzinom, die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache der Frau dar. Die individuelle Prognose kann dabei deutlich von der relativen Überlebensrate abweichen. Eine Studie aus dem Saarland untersuchte Faktoren, die sich auf das 5-Jahres-Überleben für Mammakarzinompatientinnen auswirken. Als negative prognostische Faktoren erwiesen sich ein hohes Lebensalter und eine ungünstige Tumorbilologie, wie z.B. ein hohes Tumorigradung, eine HER2neu Amplifikation oder eine Hormonrezeptornegativität. Lag ein disseminiertes Tumorstadium (UICC 4) vor, sank die 5-Jahres-Überlebensrate auf 22 % [2].

In den Daten spiegeln sich die enorme Wichtigkeit der Früherkennung und die Grenzen der bisherigen therapeutischen Möglichkeiten wider.

Zu den von den Krankenversicherungen finanzierten Früherkennungsmaßnahmen gehören eine jährliche Tastuntersuchung der Brust ab dem 30. Lebensjahr und die Mammographie. Seit 2005 können Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle zwei Jahre am Mammographie Screening teilnehmen. Durch diese Maßnahmen sollen bösartige Veränderungen der Brustdrüse in früheren Krankheitsstadien erkannt werden.

Den wichtigsten Bestandteil der Therapie stellt derzeit immer noch die Resektion des Tumors und möglichst aller Metastasen dar, was nur in begrenzten Tumorstadien möglich ist. Abhängig von der Tumorgöße und -biologie empfehlen

die Leitlinien zusätzlich eine adjuvante Therapie. Bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren wird nach den S3-Leitlinien 2017 für das Mammakarzinom, z.B. eine Ergänzung der Therapie durch eine antihormonelle Therapie empfohlen. Die wichtigsten Wirkstoffe sind Tamoxifen, ein Wirkstoff, der die Hormonrezeptoren auf der Zelloberfläche blockiert sowie Aromatasehemmer und GnRH Analoga, die die körpereigene Hormonproduktion hemmen. Für Tumore, die eine HER2neu Genamplifikation zeigen, ist der Wirkstoff Trastuzumab zugelassen. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper (AK), der an extrazelluläre Anteile des Wachstumsfaktorrezeptors HER2neu bindet. Der Rezeptor wird dadurch blockiert. Zusätzlich wird das Immunsystem durch den Fc-Teil des AKs rekrutiert.

Für Patientinnen in disseminierten Tumorstadien wird von den Leitlinien keine chirurgische Resektion mehr empfohlen. In Kombination mit weiteren negativen prognostischen Faktoren, wie einer zusätzlichen Hormonrezeptor-Negativität des Tumors, empfehlen die aktuellen S3-Leitlinien für das Mammakarzinom eine Polychemotherapie und palliative Maßnahmen. In solchen Fällen sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patientinnen auf 8 % [2].

Die relative Überlebensrate und die Früherkennungsmaßnahmen verbessern sich stetig. Durch die hohe Inzidenz des Mammakarzinoms ist die absolute Anzahl an Patientinnen mit Bedarf an neuen Therapieansätzen hoch. In dieser Hinsicht stellt das Mammakarzinom keine Ausnahme dar. Auch bei anderen soliden Tumorentitäten, wie z.B. Lungen- und Darmkrebs, ist die Prognose für Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien auch heute noch schlecht.

1.2 Bisherige Therapie solider Tumoren und neuere Forschungsfelder

Grundpfeiler der Therapie solider Tumoren sind die möglichst vollständige chirurgische Resektion, die Abtötung der Tumorzellen mittels Strahlung oder

zytostatischer/ -toxischer Substanzen, zielgerichtete Therapien und die Immuntherapie.

Bei operativem Vorgehen oder lokal destruierenden Verfahren wie der Strahlentherapie, können trotz eingehaltener Sicherheitsabstände, vitale Tumorzellen im Körper verbleiben. Insbesondere bei bereits stattgefundener Tumorstreuung oder -invasion in lebenswichtige Strukturen. Bei klinisch fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC IV) wird eine kurative Operation in der Regel nicht mehr empfohlen. Von ihrem Ausmaß abhängig, kann eine Operation zu Einschränkungen der Lebensqualität führen oder ein Mortalitätsrisiko darstellen.

Die Strahlentherapie wird durch stetige Optimierung der Bestrahlungsprotokolle und -masken immer genauer und schonender. Schädigungen des gesunden Gewebes im Umfeld des Tumors lassen sich jedoch nicht vollständig vermeiden. Falls besonders strahlensensible Organe, wie z.B. das ZNS, PNS, oder der Herzmuskel im Strahlenfeld liegen, können schwerwiegende Nebenwirkungen entstehen. In disseminierten Tumorstadien stellt die Bestrahlung keinen kurativen Ansatz mehr dar.

Trotz stetiger Verbesserung der Therapieprotokolle und der Entwicklung neuer Zytostatika bleibt die herkömmliche Chemotherapie per se unspezifisch, da die toxischen Effekte auch gesunde Körperzellen in hohem Maße betreffen. Starke Nebenwirkungen, zum Beispiel an den Schleimhäuten des Verdauungstraktes, dem Nervensystem, dem Knochenmark und an inneren Organen, wie Leber und Nieren, mindern die Lebensqualität oder stellen ein Mortalitätsrisiko dar. Sie können insbesondere bei vorerkrankten, oder älteren Patienten, therapielimitierend sein.

Durch die Selektion resistenter Tumorzellen kann es bei allen bisherigen Therapien zu einer Tumorprogression oder Rezidiven kommen, selbst nach einem klinisch diagnostizierten, kompletten Rückgang des Tumors [3]. Einer aktuell häufig untersuchten Theorie zufolge sollen hierfür spezielle Zellen innerhalb des Tumors

verantwortlich sein, sogenannte „Krebsstammzellen“. Sie schützen sich zum Beispiel durch ABC-Transporter, die zytostatische Substanzen aus dem Zellinneren schleusen, vor der Chemotherapie [4]. Um das Überleben solcher Zellen und die Therapieresistenz eines Tumors zu vermeiden, werden die Protokolle jeder dieser Therapien immer weiter optimiert. Eine Kombination verschiedener Therapieformen wird häufig empfohlen und kann die Effektivität steigern.

Als weitere Therapieformen haben die Immunonkologie und die zielgerichtete Krebstherapie stark an Bedeutung zugenommen. 1970 wurde mit Tamoxifen das erste Medikament zur zielgerichteten Therapie zugelassen. Seitdem wurden zur Behandlung verschiedenster Tumorentitäten zahlreiche Wirkstoffe zugelassen. Auch die Immunonkologie entwickelt sich rasant. Ein erster Meilenstein war die Zulassung der ersten Checkpoint Inhibitoren. Die Idee, das Immunsystem zur Tumorbekämpfung zu nutzen, entstand jedoch bereits vor über einem Jahrhundert. Paul Ehrlich vertrat schon Anfang des 20. Jahrhunderts die Hypothese, dass das Immunsystem in der Lage sei Krebszellen zu erkennen und zu zerstören. Er schloss aus seinen Versuchen, dass es eine humorale Immunität und etwas wie AK geben müsse und versuchte eine Art Tumorkvakzinierung durchzuführen und mit abgetöteten Krebszellen eine Immunreaktion gegen Tumoren zu provozieren [5]. Seine Ideen legten Grundsteine für die Immunonkologie. Jedes ihrer Felder, wie die AK-Therapie, Tumorkvakzinierung, Virotherapie und die zellbasierte Immuntherapie, sind mittlerweile große Hoffnungsträger der onkologischen Forschung.

1.3 T-Zell basierte Immuntherapie

T-Zellen sind ein Bestandteil des körpereigenen Immunsystems. Über T-Zell Rezeptoren (TCR) können sie körperfremde und mutierte körpereigene Peptide erkennen. Seit der Beschreibung zytotoxischer T-Zellen, die Tumoren infiltrieren und Krebszellen lysieren [6], wurde nach Möglichkeiten gesucht diese Fähigkeiten

für die Krebstherapie auszunutzen. Grundlagenforschungen konnten zeigen, dass tumorspezifische T-Zellen in der Lage sind, Krebszellen disseminierter und solider Tumorentitäten spezifisch zu erkennen und abzutöten [7-9]. Dies führte zu den ersten adoptiven T-Zell Transfers. Bei dieser Methode werden tumorspezifische T-Lymphozyten aus dem Vollblut eines Patienten isoliert, expandiert und in seinen Blutkreislauf zurückinfundiert [10].

Obwohl es bei einem Teil der Patienten zu einem Ansprechen kommen kann, sind die Langzeitergebnisse aktuell nicht überzeugend. Um unabhängig von bereits vorhandenen tumorspezifischen T-Zellen eine TCR-Spezifität gegen ein gewünschtes Zielantigen zu erreichen, kann man heutzutage mittels gentechnischer Verfahren transgene T-Zellen im Labor generieren und dem Patienten verabreichen. Die Voraussetzung hierfür ist eine vorhandene Gensequenz eines TCR, gegen ein tumorassoziiertes oder tumorspezifisches Peptid, das auf einem MHC Molekül präsentiert werden kann. [11, 12]. Eine heterogene Expression tumorassoziiertes/-spezifischer Peptide oder die Herunterregulierung von MHC Molekülen senkt die Effizienz einer solchen Therapie. Hierdurch ist der Tumor für spezifische T-Zellen nicht mehr sichtbar. Das kann zu Tumorrezidiven oder fehlendem Therapieansprechen durch T-Zell Therapien führen [13].

Weitere Entwicklungen auf diesem Forschungsfeld sind die Modifizierung der T-Zell Funktion durch MHC unabhängige, chimäre AG-Rezeptoren (CAR) oder die autogene Produktion aktivierender Zytokine [14, 15].

1.4 Chimäre Antigenrezeptor exprimierende T-Zellen

1989 wurde von Gross et al der erste chimäre TCR entworfen. Chimär bedeutet, dass die Bestandteile des Rezeptors verschiedenen Quellen entstammen. Die konstanten Regionen des TCR, die für die Signalweiterleitung und Aktivierung der T-Zelle verantwortlich sind, wurden beibehalten und die variablen Regionen des

TCR durch die AG-bindende Region eines monoklonalen AKs ersetzt. Das Gen für diesen chimären Rezeptor wurde in das Genom der T-Zellen transduziert. Auf diese Weise wurden T-Zellen generiert, die einen Rezeptor exprimieren, der MHC unabhängig extrazelluläre AG erkennen kann. Es konnte eine zielgerichtete Effektorfunktion nachgewiesen werden [15].

Seither wurden die chimären Rezeptoren weiter verbessert. Es entstanden mehrere Generationen, die mittlerweile als chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs) bezeichnet werden. Der prinzipielle Aufbau eines CAR ist in Abbildung 1, am Beispiel eines CAR der zweiten Generation, dargestellt. CARs bestehen aus einer Ektodomäne (1), einer Transmembrandomäne (2) und einer Endodomäne (3).

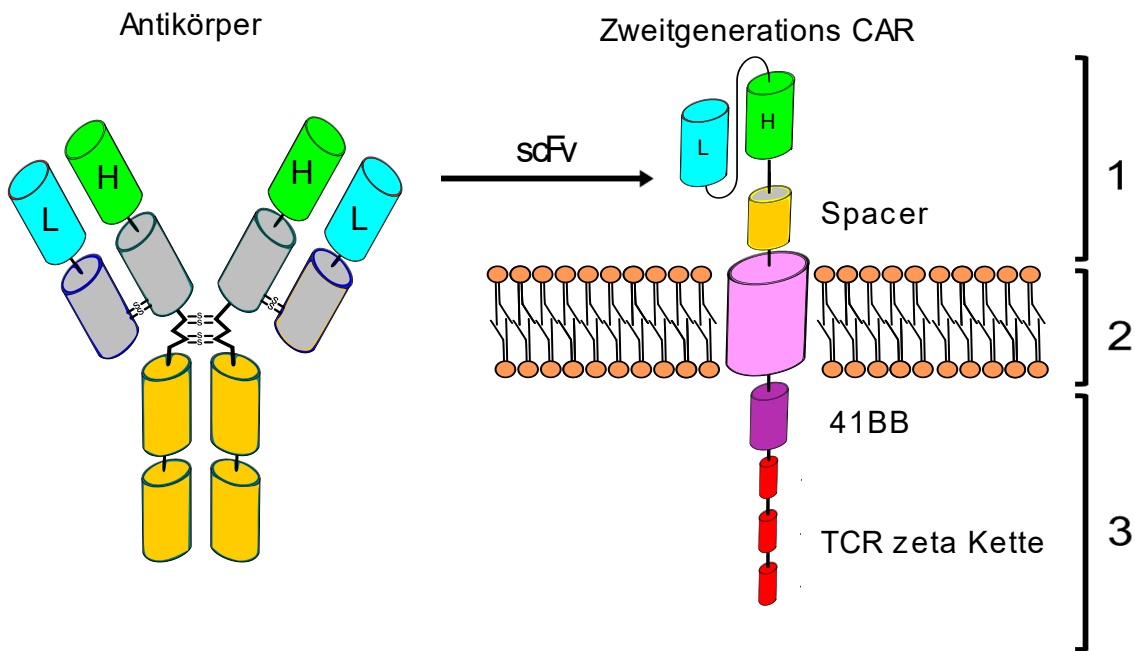


Abbildung 1: Aufbau eines Chimären Antigenrezeptors (CAR) der zweiten Generation

Der CAR (rechts) besteht aus einer Ektodomäne (1), einer Transmembrandomäne (2) und einer Endodomäne (3). Die AG-erkennung erfolgt durch eine variable, AG-erkennende Domäne. Sie ist analog zu der scFv eines AK (links). L = leichte Kette, und H = schwere Kette der scFv. Den Abstand zwischen scFv und der Transmembrandomäne kann durch einen Spacer bestimmt werden (gelb). Die Endodomäne besteht aus den Signalweiterleitenden und -verstärkenden Bestandteilen 41-BB und der zeta Kette eines TCR.

Die Ektodomäne ist für die Erkennung des Ziel-AG verantwortlich und besteht aus der antigenerkennenden Region (scFv =Single chain variable fragment) eines AK und einem Platzhalter (Spacer), z.B. aus der konstanten Region eines AK (CH2, CH3). Für die Weiterleitung des Signals durch die Zellmembran werden üblicherweise die Transmembrandomänen der Moleküle CD4, CD8 oder CD28 verwendet. Die Endodomäne ist für die Aktivierung der T-Zelle verantwortlich. Dies geschieht bei T-Zellen physiologisch durch die Phosphorylierung tyrosinbasierter Aktivierungseinheiten (ITAMs). Sie sind Bestandteil der intrazellulären Region der CD3- ζ Domäne des TCR Komplexes [16, 17].

CARs der zweiten Generation besitzen zur Signalverstärkung ein costimulatorisches Molekül, CARs der dritten Generation zwei. Hierfür kommen beispielsweise CD27, CD28, 41-BB und OX40 zum Einsatz [18, 19]. Die Expression der chimären Antigenrezeptoren erfolgt nach dem Einschleusen der notwendigen DNA/RNA durch viralen Gentransfer oder der Elektroporation.

1.5 Bisheriger Einsatz und Limitation der CAR-T-Zell Therapie

Chimäre Antigenrezeptor exprimierende T-Zellen haben in Studien eine bemerkenswerte antitumorale Aktivität gezeigt. In den USA hat dies bereits zur Zulassung zwei verschiedener CAR-T-Zell Produkte durch die food and drug administration (FDA) geführt. Beide Produkte sind gegen CD19 als Zielantigen gerichtet. CD19 ist ein transmembran Glykoprotein, das mit Ausnahme von hämatopoetischen Stammzelle und Plasmazellen auf allen Zellen der B-Zell Reihe exprimiert wird. Auch die maligne entarteten B-Zellen bei akuten lymphatischen Leukämien (B-ALL), chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), tragen es überwiegend auf ihrer Oberfläche. Im August 2017 bekam Kymriah (tisagenlecleucel) eine Zulassung für die Therapie der B-ALL. Mittlerweile besitzt es eine zweite Zulassung für bestimmte Formen des diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL). YesCARta (axicabtagene

ciloleucel) wurde im Oktober 2017 als zweite CAR-T-Zell Therapie für bestimmte Formen des DLBCL zugelassen. In Studien haben CD19-CAR-T-Zellen bei bis zu 90 % der zuvor therapierefraktären Patienten komplette Remissionen über Monate bis zu mehreren Jahren erzielt [20-25].

Neben diesen herausragenden Ergebnissen, bei der Therapie von B-Zell Malignomen, zeigten die Studien auch die Schwächen und Nebenwirkungen der CAR-T-Zell Therapie:

CRS: CAR-T-Zellen werden bei AG Kontakt aktiviert, woraufhin sie Zytokine freisetzen und expandieren. Durch die Aktivierung kann es zu einem SIRS-artigen Krankheitsbild, dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (CRS) kommen [26]. Das CRS muss durch immunsuppressive Maßnahmen, wie der Gabe des IL6-Blockers Tocilizumab, behandelt und intensivmedizinisch betreut werden [26]. Bei den bisherigen CAR-T-Zell Studien wurden außerdem neurotoxische Nebenwirkungen beobachtet. Für das CRS und die Neurotoxizität scheinen eine große Tumormasse und ein ZNS-Befall zwar Risikofaktoren, aber keine Bedingung darzustellen [27]. Die genauen Zusammenhänge und ob neurologische Symptome auch bei anderen Ziel-AG und Tumorentitäten zu erwarten sind, ist bisher nicht vollständig geklärt [28].

„on Target, off Tumor“ Toxizität: (OTOT) Der Anspruch an ein gutes CAR-T-Zell Produkt ist eine antigenspezifische, antitumorale Aktivität. Um Patienten auch vor späten Rezidiven und Metastasen zu schützen, sollen die Zellen lebenslang im Körper persistieren und bei Bedarf expandieren. Kommt ein Zielantigen (engl. Target-AG) nicht ausschließlich auf malignen Zellen vor, kommt es zu einer „on Target, off Tumor“ Toxizität. Das gewünschte Zielantigen wird unabhängig davon, ob es sich auf einer gesunden oder malignen Zelle befindet, erkannt. CD19 kommt beispielsweise auf Blasten und auf gesunden Zellen der B-Zell Reihe vor. Eine Nebenwirkung der CD19 spezifischen CAR-T-Zell Therapie ist folglich eine anhaltende B-Zell Aplasie [29]. Sie kann durch die Gabe von Immunglobulinen kompensiert werden und ist in Anbetracht der erlangten Tumorfreiheit eine

tolerierbare Nebenwirkung. Kommen Ziel-AG jedoch gleichzeitig auf überlebenswichtigen Zellreihen vor, können die Nebenwirkungen lebensgefährlich sein, wie eine Studie mit ErbB2 (Her2neu) spezifischen CAR-T-Zellen zeigte. Dieser Rezeptor kann von Tumoren durch eine Genamplifikation übermäßig exprimiert werden. Der klinische AK Trastuzumab blockiert diesen Rezeptor und reduziert das Wachstum und die Vitalität solcher Tumoren. Auch von Herz- und Lungenzellen wird dieser Rezeptor gering exprimiert. ErbB2 ist ein Beispiel für sogenannte „geteilte Antigene“. Trastuzumab ist in der Therapie des Mammakarzinoms ein fest etabliertes Medikament. Bei der Gabe von ErbB2-spezifischen CAR-T-Zellen, kam es jedoch zu tödlichen Nebenwirkungen. Die genaue Ursache ist nicht geklärt. Sowohl ein „on Target, off Tumor“ Effekt durch die ErbB2-Expression auf Lungenepithelzellen, als auch ein CRS, durch die Gabe einer zu hohen CAR-T-Zell Anzahl werden diskutiert [30]. Die Aktivität der CAR-T-Zellen hätte in beiden Fällen gestoppt werden müssen, was bei konventionellen CAR-T-Zellen nicht ausreichend möglich ist. Darum wurden viele Konzepte zu an- und abschaltbaren CAR-T-Zellen entworfen [31]. Dazu gehört die transiente, mRNA gesteuerte CAR-Expression [32], der Einbau von ansteuerbaren Suizidgenen in die CAR-T-Zellen [33, 34], oder der Entwurf eines pharmakologisch steuerbaren Schalters, mit dessen Hilfe sich die CAR-T-Zell Aktivität regulieren lässt [35, 36]. Auch das hier getestete Adapter-CAR (AdCAR) System bietet die Möglichkeit einer Abschaltung.

1.6 AdCAR-T-Zellen

Beim AdCAR System unserer Arbeitsgruppe werden die Antigenerkennung und die Aktivierung der T-Zelle auf zwei Bausteine aufgetrennt (s. Abbildung 2). Die Bindung an das Antigen (AG) erfolgt durch Adaptermoleküle (AM). Als AM werden biotinylierte AK (bAK) oder AK-Fragmente verwendet. Die variable Region des AK dient als AG-Bindungseinheit. Die konstante Region ist durch ein Verbindungsstück (Linker) mit Biotin (Label) verknüpft. Dieses Linker-Label-Epitop

(LLE) kann von der AdCAR-T-Zelle erkannt werden und dient dadurch als CAR-Bindungseinheit. Die Erkennung der Zielzellen durch die AdCAR-T-Zelle erfolgt

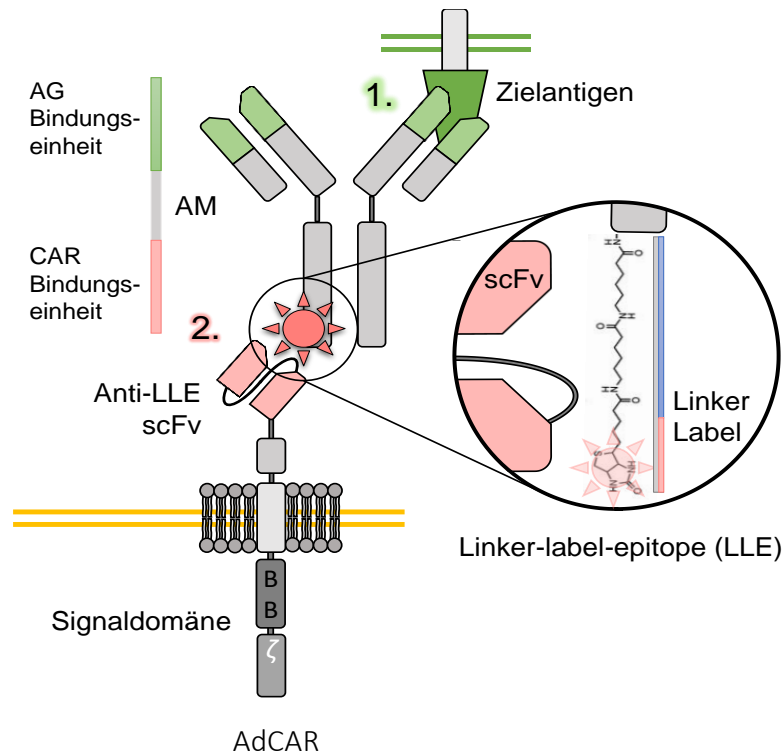


Abbildung 2: Indirekte Erkennung des Zielantigens durch einen AdCAR mittels Biotinadapter

Das Zielantigen (oben) wird in einem ersten Schritt direkt von dem Adaptermolekül (AM) gebunden. Die Bindung erfolgt an der Antigen-bindenden-Einheit (AG Bindungseinheit). Das AM besitzt außerdem eine CAR Bindungseinheit (Linker-label-Epitope (LLE)). Hier ist es über eine Verbindung (Linker) mit Biotin (Label) verknüpft. Der AdCAR einer AdCAR-T-Zelle (unten) besitzt eine Anti LLE scFv. Hiermit bindet der AdCAR in einem zweiten Schritt spezifisch an das AM und somit indirekt an das Zielantigen.

somit indirekt und nur über ein passendes AM. Durch einen Austausch des AM kann ohne eine Neukonstruktion der AdCAR-T-Zelle das Zielantigen gewechselt werden, oder die Reaktivität abgeschaltet werden, wenn kein AM, oder ein irrelevantes AM gegeben wird.

1.7 Screening Plattform für individuelles Immuntargeting solider Tumoren

Um die Vorteile der AdCAR-T-Zell Therapie nutzen zu können, benötigt man eine geeignete Methode, um die Antigenexpression eines Tumors zu untersuchen und zu evaluieren. Hierfür wurde in dieser Arbeit eine Screeningplattform für individuelles Immuntargeting (SPIIT) für solide Tumoren entworfen und etabliert. Der zukünftige Einsatz der SPIIT soll in die Klinik wie im Folgenden beschrieben implementiert werden.

Aus dem Tumor eines Patienten wird eine Probe entnommen. Die Tumorzellen werden mit einer Auswahl an bAK inkubiert (Antigenpanel s. Abschnitt 2.3). Mittels Durchflusszytometrie wird evaluiert, ob und in welchem Ausmaß mögliche Ziel-AG exprimiert werden. Dadurch lässt sich vorhersagen welche Ziel-AG, individuell für den Patienten, in einer AdCAR-T-Zell Therapie verwendet werden könnten.

Aus dem Blut des Patienten werden T-Zellen isoliert und AdCAR-T-Zellen generiert. Nach vorheriger Lymphodepletion werden AdCAR-T, in Kombination mit geeigneten Adaptermolekülen, in den Patienten infundiert. Die Infusion der Adaptermoleküle erfolgt individuell und angepasst an eine Auswahl stark exprimierter Ziel-AG auf dem Tumor des Patienten. Im Fall eines Tumorprogress kann durch ein erneutes Antigen screening, einer erneuten Tumorprobe, die Therapie reevaluiert und angepasst werden.

Zur Testung des AdCAR-Systems und der SPIIT wurde ein Panel von 12 Ziel-AG verwendet. Die AdCAR-T-Zellen und die SPIIT wurden an Brustkrebszelllinien als relevante Vertreter solider Tumoren getestet. Die Expression der Ziel-AG wurden auf Brustkrebszelllinien getestet und anschließend funktionell getestet. Die tumorassoziierten Antigene wurden nach einer Literaturrecherche und unter Berücksichtigung einer möglichen, klinischen Translation ausgewählt.

1.8 Plan und Hypothese der Arbeit

Folgende Hypothesen wurden aufgestellt:

Mit Hilfe des neuen AdCAR lassen sich AdCAR-T-Zellen generieren, die in Kombination mit theoretisch jedem bAK und abhängig von der Anwesenheit und Menge des von ihm spezifisch gebundenen Ziel-AG auf der Tumorzelle, eine Lyse solider Tumorzellen bewirken.

Die SPIIT Plattform eignet sich für die Evaluation der Effektivität und Spezifität von Antigenen als Ziel-AG für die AdCAR-T-Zellen in vitro. Durch das Screening einer Tumorprobe, lassen sich geeignete Antigene ermitteln.

Um diese Hypothesen zu untersuchen wurde folgender Arbeitsplan aufgestellt:

1. Herstellung lentiviraler Vektoren, um das AdCAR Gen stabil in das Genom der T-Zellen zu integrieren.
2. Screening der fünf kommerziellen Brustkrebszelllinien nach den 12 Ziel-AG, durch semiquantitative Analyse der bAK Bindung, mittels Durchflusszytometrie.
3. Herstellung der AdCAR-Ts aus T-Zellen gesunder Spender.
4. Funktionelle Testung des AdCAR-Systems an den fünf gescreenten Brustkrebszelllinien und der aus einer Metastase gewonnenen, primären Brustkrebs-Zellkultur.
5. Simulation des Gebrauchs der SPIIT Plattform mit Patientenzellmaterial.
6. Metaanalyse der gewonnenen Daten und Diskussion der Hypothesen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 1 sind die Plastik- und Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers und der Bestellnummer aufgelistet.

Tabelle 1: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Artikelbezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
50 ml Spritze, Luer-Lok	BD Plastipak	300869
Falcon 15ml	Cellstar, greiner bio-one	188 271
Falcon 50ml	Falcon	352070
Hämozytometer, Deckglas 20x26mm	Assistent	40415710
Hämozytometer, Neubauer improved	Assistent	40442002
Pipettenspitzen 100-1000 µl	CRYO.S, greiner bio-one	122263
Pipettenspitzen 10-200 µl	SARSTED	70.760.002
Pipettenspitzen 1-10 µl	Biozym Biotech	720011
Polystyrene Röhren 5 ml (FACS Tubes)	FALCON	352008
Stripette 10 ml,25 ml	Costar	4101/4251
Stripette 2 ml,5 ml	Costar	4021/4051
Stripette 50 ml	Costar	4501
Zellkulturflasche T25, T75, T175	Cellstar, greiner bio-one	690 175
Zellkulturplatte, E-Plate 96, 96 Kv	ACEA Biosciences Inc	2801035
Zellkulturplatte, weiß, 96 Kv	Greiner bio-one	655083
Zellkulturplatten, 24 Kv	Costar	3524
Zellkulturplatten, 6 Kv	Cellstar	657 160

2.1.2 Zellkulturmedien und -zusätze

In Tabelle 2 sind die Zellkulturmedien und –zusätze, der Hersteller und die Bestellnummern aufgelistet.

Tabelle 2: Zellkulturmedien und -zusätze

Artikelbezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom	S0115
L-Glutamin 200 mM (L-Glut)	Biochrom	K0282
Nährmedium Opti-MEM	ThermoFisher Scientific	11520386
Nährmedium RPMI 1640	Biochrom	F 1215
Nährmedium RPMI 1640, GlutaMAX	ThermoFisher Scientific	61870010
Nährmedium TexMACS GMP	Miltenyi Biotec	170-076-306
Nährmedium VLE DMEM	Biochrom	FG 1445
Penicillin + Streptomycin	Biochrom	K02822
HEPES (1 M)	ThermoFisher Scientific	15630080

2.1.3 Stammlösungen

Für die Zellkultivierung und Versuchsdurchführung wurden verschiedene Stammlösungen benötigt. Im folgenden Abschnitt sind die Stammlösungen unter Angabe der Verwendung und der Zusammensetzung aufgelistet.

Stammlösung (SL) A: Für die Zelllinie MC-1

- 500 ml RPMI GlutaMAX + 5 ml P/S + 50 ml FCS (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert (h.i.))

SLB: Für die kommerziellen Brustkrebszelllinien

- 500 ml Dulbeccos VLE DMEM + 5 ml P/S + 50 ml FCS (30 min bei 56 °C h.i.)

SLC: Für durchflusszytometrische Färbungen, MACS, FACS

- 1000 ml CliniMACS PBS/EDTA + 10 ml humanes Serumalbumin (HSA)

SLD: Für die AdCAR-T-Zell Herstellung und Expansion

- 50 ml TexMACS + 500 µl P/S + 50 µl IL7 + 25 µl IL15

SLE: Für die Kultivierung der AdCAR-T-Zellen, 48 h vor Versuchsbeginn

- 50 ml TexMACS + 500 µl P/S

2.1.4 Flüssigkeiten und Chemikalien

In Tabelle 3 sind die verwendeten Flüssigkeiten und Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 3: Flüssigkeiten und Chemikalien

Artikelbezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
Bad Stabil	NeoLab Migge GmbH	1-6095
CliniMACS PBS/EDTA	Miltenyi Biotec	700-29
Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH	00-311-010
Dimethylsulfoxid (DMSO)	OriGen Biomediacals	V10050
FACS Shutdown Solution	Becton, Dickinson GmbH	334224
FACSClean	Becton, Dickinson GmbH	340345
FACSFlow	Becton, Dickinson GmbH	342003
FACSRinse	Becton, Dickinson GmbH	340346
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm	Ch.-B. T23531A
Human-Albumin, 20 %	CSL Behring GmbH	J9344411A
Isopropanol	Interlock Medizintechnik GmbH	02009
PBS	Sigma-Aldrich	P5119
Privigen IVIg, 100 mg/ml	CSL Behring	Ch.-B: 43282000024
Trypanblau (0,4 %)	Sigma	93595
Trypsin-EDTA, 0,05 %	Gibco	LS25300062

2.1.5 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte sind unter Angabe des Herstellers in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
ABL800 Flex	Radiometer
ADVIA120	BAYER
Brutschrank HeraCell	Heraeus
Durchflusszytometer: BD LSR II Flow Cytometer BD FACSAria II Cell Sorter Angeschlossene Hardware, PC	BD Biosciences BD Biosciences Hewlett-Packard
Einfrierhilfe Mr Frosty®	Qualilab
Eismaschine	Scotsman
Elektrische Pipette, Pipetboy2	Integra
Gefrierschrank	Liebherr
Kryokonservierungstank, Kinderklinik, UKT	Cryostorage System
Kühlschrank	Liebherr, Bosch
Mehrkanalpipette 20-200 µl	Brand
Mikroskop, Durchlicht CX40LF200	Olympus
Mikroskop, Inversion IX50	Olympus
Pipette Research, 0,1-2,5 µl	Eppendorf
Pipetman: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus instruments
Viktor 1420 Multilabel Counter Angeschlossene Hardware, PC Windows 95	Counter Wallac Compaq
Vortexer MS1 Minishaker	IKA
Wasserbad 10 Liter	Memmert
Wasserbad 1804	GFL

Gerätebezeichnung	Hersteller
xCELLigence Single Plate Platereader	ACEA Biosciences Inc.
Zähluhr	IVO
Zentrifuge Rotanta 46 RSC	Hettich
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich
Zentrifuge Rotixa 50RS	Hettich

2.1.6 Verwendete Zentrifugenprogramme und -einstellungen

In Tabelle 5 sind die verwendeten Zentrifugenprogramme und die dazugehörigen Einstellungen aufgelistet. Der Kommentar gibt Auskunft darüber, für welche Arbeitsschritte die Programme verwendet wurden.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zentrifugenprogramme

Pr.	Radius	T/°C	Anlauf	Auslauf	RCF/g	t/min	Kommentar
1	183	20	1	1	800	30:00	Ficoll 1
2	183	20	9	9	500	10:00	Ficoll 2
3	183	20	9	9	400	10:00	Ficoll 3
4	183	4	9	9	350	05:00	FACS
5	183	4	9	7	200	10:00	MACS
6	183	20	9	7	250	05:00	T-Zellen waschen
7	159	32	9	0	800	30:00	Tansduktion
8	183	4	9	9	1500	45:00	Virale Vektoren
9	183	20	9	9	300	05:00	Zelllinien waschen

2.1.7 Software

In Tabelle 6 ist die verwendete Software mit Angabe des Herstellers und des Verwendungszweckes aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Software

Name der Software	Hersteller	Verwendung
BD FACSDIVA v6.1.3	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
Excel 2016	Microsoft	Zytotoxizitätsversuche
Word 2016	Microsoft	Dissertationsschrift
PowerPoint 2016	Microsoft	Abbildungen
Inkscape 0.92.0	Inkscape community	Abbildungen
Flowjo v10.0	Becton, Dickinson	Auswertung, Abb.
GraphPad Prism 7	GraphPad Software	Statistik, Abbildungen
RTCA	ACEA Biosciences Inc.	Impedanzmessung
Wallac1420 Workstation	Wallac	Biolumineszenzmessung

2.2 Spezielle Materialien

In Tabelle 7 sind weitere, spezielle Materialien, deren Hersteller und Bestellnummern angegeben.

Tabelle 7: Spezielle Materialien

Artikelbezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
Anti CD8 Microbeads	Miltenyi Biotec	130-045-201
Anti-CD4 Microbeads	Miltenyi Biotec	130-045-101
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH	L6115
IL15, human	Miltenyi Biotec	130-095-765
IL7, human	Miltenyi Biotec	130-095-364
LS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-401
D-Luciferin, synthetisch	Sigma-Aldrich	L9504-10 MG
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	130-042-401
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec	130-090-976
Safety-Multifly-Kanüle, 21 G	Sarstedt	85.1638.235
TransACT, human	Miltenyi Biotec	130-111-160
Spritzenfilter, 0,45 µm	Millex - HP	SLHP033RS
Lipofectamin p3000	ThermoFisher	L3000008
Lenti-X Concentrator	Takara	631231
Plasmide	Miltenyi Biotec	Nicht regulär bestellbar
Plasmid LucGFP/ LucmCherry	Zur Verfügung gestellt von Irmela Jeremias [37]	
CompBeads, a-Mouse	BD Biosciences	51-90-9001229

2.3 Antikörper

Tabelle 8 zeigt die für das Antigenscreening verwendeten AK. Tabelle 9 zeigt die für die T-Zell Färbungen verwendeten AK.

Tabelle 8: Liste der für das Antigenscreening verwendeten AK

Name des AK	Konzentration	Klon	Hersteller	Bestellnr.
Anti-CD47 Biotin	11ng/µl	REA220	Miltenyi	130-101-342
Anti-CD66 Biotin	11ng/µl	TET2	Miltenyi	130-093-156
Anti-CD112 Biotin	11ng/µl	R2.525	Miltenyi	130-109-000
Anti-CD133 Biotin	11ng/µl	REA820	Miltenyi	130-112-193
Anti-CD146 Biotin	11ng/µl	541-10B2	Miltenyi	130-092-850
Anti-CD171 Biotin	11ng/µl	REA163	Miltenyi	130-100-702
Anti-CD276 Biotin	11ng/µl	FM276	Miltenyi	130-095-514
Anti-CD326 Biotin	11ng/µl	HEA-125	Miltenyi	130-098-793
Anti-ROR1 Biotin	11ng/µl	2A2	Miltenyi	130-098-312
Anti-SSEA4 Biotin	11ng/µl	REA101	Miltenyi	130-098-339
Trastuzumab Bio.	200ng/µl	4D5-8	Uniapotheke	Restbestand
Cetuximab Biotin	200ng/µl	C225	Uniapotheke	Restbestand
REA-control Biotin	30ng/µl	REA293	Miltenyi	130-104-622
Anti Biotin FITC	11ng/µl	Bio3-18E7	Miltenyi	130-090-857

Tabelle 9: Liste der für die Effektoren verwendeten AK

Name des AK	Konzentration	Klon	Hersteller	Bestellnr.
CD4 BUV395		SK3	BD	563550
CD8 PCVio770	11ng/µl	BW135/80	Miltenyi	130-096-561
LNGFR FITC	11ng/µl	ME20.4-1.H4	Miltenyi	130-091-917

2.4 Humanes Zellmaterial

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellmaterialien sind in Tabelle 10 unter Angabe der Gewebeeigenschaften und der Zellherkunft zusammengefasst. Tabelle 11 beinhaltet weiterführende Informationen zu den kommerziellen Brustkrebszelllinien [38]. Mammakarzinome bilden keine homogene Gruppe. Die Auswahl verschiedener Subtypen sollte die Heterogenität dieser Tumorentität nachstellen.

Tabelle 10: Übersicht über das verwendete, humane Zellmaterial

Bezeichnung	Gewebeeigenschaften	Herkunft
AdCAR-T-Zellen	Transduzierte, humane T-Zellen	D1-D4, Patientenmaterial
HEK293T	Hum. embryonale Nierenzellen	ATCC
MC-1	Brustkrebsmetastase	Patientenmaterial
BT549	Etablierte Brustkrebszelllinie	Hertie Institut
HS578T	Etablierte Brustkrebszelllinie	Hertie Institut
MCF7	Etablierte Brustkrebszelllinie	Hertie Institut
MDA-MB-468	Etablierte Brustkrebszelllinie	Hertie Institut
T47D	Etablierte Brustkrebszelllinie	Hertie Institut

Tabelle 11: Klassifizierung der kommerziellen Brustkrebszelllinien

	MCF7	T47D	BT549	HS578T	MDA-MB-468
Subtyp	Luminal A	Luminal A	Basal B/ MSL/CL*	Basal B/ MSL/CL*	Basal B
Östrogenrezeptor	Positiv	Positiv	Dreifach negativ	Dreifach negativ	Dreifach negativ
Progesteronrezeptor	Positiv	Positiv			
HER2 onkogen Amplifikation	Negativ	Negativ			

*mesenchymal stemlike/ Claudin low

2.4.1 Primärzellkultur aus einer Metastase

Das Material für die Zellkultur MC-1 stammt aus der Fernmetastase eines Mammakarzinoms.

Ein Ethikvotum liegt vor: 761/2015B02

Die Metastase war in der linken Scapula der Patientin lokalisiert. Der vor drei Jahren chirurgisch, sowie strahlentherapeutisch behandelte Primärtumor, befand sich an ihrer linken Brust. Zum Zeitpunkt der Resektion fand keine zytotoxische Behandlung statt. Nach der Resektion in der orthopädischen Klinik Tübingen durch Dr. Dr. F. Traub und der Begutachtung im pathologischen Institut Tübingen, wurde ein Teil der Metastase freigegeben und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die histologische Untersuchung ergab:

Diagnose: Metastase des klinisch bekannten Mammakarzinoms, kein spezieller Typ mit lobulärer Wachstumscharakteristik.

Hormonrezeptorstatus:

Östrogenrezeptor: Positiv, IRS: 12, 100 %

Progesteronrezeptor: Positiv, IRS: 12, 100 %

HER2-Onkoprotein: Nicht therapielevant

DAKO-Score: 2 +

FISH: Nicht amplifiziert.

Frau Dr. Sabine Schleicher (Universitäts-Kinderklinik, Tübingen) stellte aus dem Patientenmaterial eine Zellkultur her, die als MC-1 bezeichnet wurde und stellte sie für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung.

2.5 Herstellung lentiviraler Vektoren

In dieser Arbeit wurden lentivirale Vektoren der zweiten Generation verwendet, um ein Luciferase-Gen in Tumorzellen und das AdCAR-Gen in T-Zellen einzuschleusen. Dabei handelt es sich um genetisch modifizierte Lentiviren die das zu übertragende Gen beinhalten und in das Genom einer Zelle integrieren können. Die zur Replikation des Virus benötigten Gene wurden aus dem Genom der lentiviralen Vektoren entfernt.

Die Synthese der Vektoren erfolgte durch transfizierte HEK293T-Zellen. Zur Transfektion der HEK29T-Zellen (Protokoll s. Anhang S.73, 6.1.1) wurde das gewünschte Gen zunächst in ein Transferplasmid integriert. Danach konnte es gemeinsam mit zwei Helferplasmiden in HEK293T-Zellen transfiziert werden. Die Helferplasmide codierten für das zur Fusion benötigte Protein VSV-G (envelope Plasmid) und die lentiviralen Proteine: Gag, Pol, Rev und Tat (packaging Plasmid). Die Helferplasmide, das Transfer- und Ad-CAR-Plasmid stammten von Miltenyi Biotec. Die Luc-mCherry und -GFP Plasmide wurden uns von Prof. Dr. Irmela Jeremias zur Verfügung gestellt. Innerhalb der HEK293T-Zellen wurde das Transferplasmid vervielfältigt und die Helferplasmide zur Proteinbiosynthese abgelesen. Aus den synthetisierten Proteinen wurden in den HEK293T-Zellen virale Vektoren zusammengesetzt, die das gewünschte Gen beinhalteten. Sie konnten aus dem Zellkulturmedium gewonnen werden (Protokoll s. Anhang S.73, 6.1.1).

2.6 Kultivierung der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien (Tabelle 12, Spalte 1) wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Es handelte sich um adhärent wachsende Tumorzellen. Um den Zellen ausreichend Raum für ihr Wachstum zu bieten, mussten sie regelmäßig abgelöst und in geringerer Anzahl umgesetzt werden (Protokoll s. Anhang S.74, 6.1.2).

Tabelle 12: Kultivierung der Tumorzelllinien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Aussaatdichte	Passagezeit
BT549	SLB	20000/cm ²	3-4 Tage
HS578T	SLB	20000/cm ²	3-4 Tage
MCF7	SLB	40000/cm ²	3-4 Tage
T47D	SLB	40000/cm ²	3-4 Tage
MDA-MB-468	SLB	40000/cm ²	3-4 Tage
MC-1	SLA	20000/cm ²	3-4 Tage

2.7 Transduktion der Karzinomzelllinien

Für die Biolumineszenz basierten Zytotoxizitätsversuche musste in die Versuchszellen ein Luciferase-codierendes Gen (LUC-GFP oder LUC-mCherry) stabil integriert werden. Hierfür wurden lentivirale Vektoren verwendet. Die Transduktion fand in 24 Kv Zellkulturplatten statt. Die Aussaat erfolgte wie üblich (s. Tabelle 12), jedoch ohne Serumzusatz. Pro Kv wurden 50 µl Virusüberstand verwendet. Um Zellen und Viren in räumliche Nähe zu bringen, wurden die Platten bei Programm 7 zentrifugiert. Das Medium wurde nach sechs Stunden (mit der für die Zelllinie üblichen SL) verdoppelt und nach zwei Tagen komplett ausgetauscht. Bei 80 % Konfluenz wurde nach Zellpflege-Protokoll fortgefahren.

2.8 Durchflusszytometrie

2.8.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers

In einem Durchflusszytometer passieren Zellen Laserstrahlen. Dabei verändern sie, abhängig von ihren physikalischen Eigenschaften oder der Anfärbung mittels Fluorochromen, die Richtung und Wellenlänge der Laserstrahlen. Das gestreute oder emittierte Licht passiert Spektralfilter und wird danach von Detektoren

aufgezeichnet. Die Messergebnisse können in Echtzeit aufgezeichnet und als Diagramme dargestellt werden. Die Zellen passieren das Zytometer durch eine Kapillare. Adhärente Zellen müssen zuvor mit Trypsin in Suspension gebracht werden. Um die Zellen zu vereinzeln, wird am Rand der Kapillare ein zweiter, schnellerer Flüssigkeitsstrom eingeleitet.

Die beiden laminaren Strömungen vermischen sich nicht. Der schnellere Strom umhüllt den Probenstrom, der die Zellen beinhaltet. Der Probenstrom wird eingeeengt und in Flussrichtung gestreckt. Durch diese hydrodynamische Fokussierung gelangen die einzelnen Zellen in zeitlichem und räumlichem Abstand in die Messkammer. Hier befinden sich die verschiedenen Laser, Lichtfilter und -detektoren. Während sie die ersten Laser durchlaufen wird das zur Längsachse des Lasers gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, engl.: Forwardlightscatter - FSC) und das 90° zur Seite hin gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht, engl.: Sidewardlightscatter – SSC) aufgezeichnet. Das FSC ist proportional zur relativen Zellgröße, das SSC steigt mit zunehmender Granularität der Zellen.

Um zusätzlich AG auf den Zellen nachzuweisen, markiert man sie durch eine AG-AK-Bindung mit AK. Die AK können mit einem Fluorochrom konjugiert sein (Primärfärbung) oder in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom konjugierten AK markiert werden (Sekundärfärbung). Nach der Anregung durch die Laser emittieren Fluorochrome Licht, das durch das Durchflusszytometer detektiert werden kann. In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer LSR II der Firma Becton Dickinson GmbH verwendet.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verwendeten Fluorochrome, sowie die zu ihrer Messung benötigten Geräteeinstellungen.

Tabelle 13: Verwendete Fluorochrome und Zytometereinstellungen

Fluorochrom	Exzitation _{max}	Laser	Langpassfilter	Bandpassfilter	Detektion
APC	650 nm	633 nm	keiner	670/30 nm	660 nm
APC vio770	652 nm	561 nm	750 nm	780/60 nm	775 nm
BUV395	348 nm	355 nm	keiner	379/28 nm	395 nm
eFluor780	633 nm	633 nm	755 nm	780/60 nm	780 nm
FITC	495 nm	488 nm	505 nm	525/50 nm	519 nm

2.8.2 Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Die Auswertung erfolgte mit FacsDiva, FlowJO und Excel. Das Vorgehen ist in Abbildung 3 dargestellt. Die erste Umrandung (Gate) umfasste in einem SSC/FSC Punktdiagramm die Hauptpopulation (Abbildung 3a). Falls eine Viabilitätskontrolle nötig war, wurde die Hauptpopulation in einem weiteren Punktdiagramm auf ihre Positivität für einen Apoptosemarker kontrolliert. Die weitere Auswertung inkludierte nur Zellen, die negativ für den Apoptosemarker eFluor780 waren (Abbildung 3b). Das nächste Gate (Abbildung 3c) wurde um die Population einzelner Zellen gelegt. Nur bei runden Einzelzellen sind die Parameter FSC-A und FSC-H proportional zueinander. Zellaggregate sind als Ausreißer aus der linearen Population zu erkennen und konnten exkludiert werden. Die inkludierten Zellen wurden auf die Positivität für das verwendete Fluorochrom untersucht (s.

Tabelle 13). Die Intensität der spezifischen Antigenfärbung wurde mit der unspezifischen Fluoreszenz einer Isotypkontrolle verglichen. Für genauere Analysen konnten die Werte overton positiv (Abbildung 3d, gelbe Fläche) und MFIR in Excel exportiert werden.

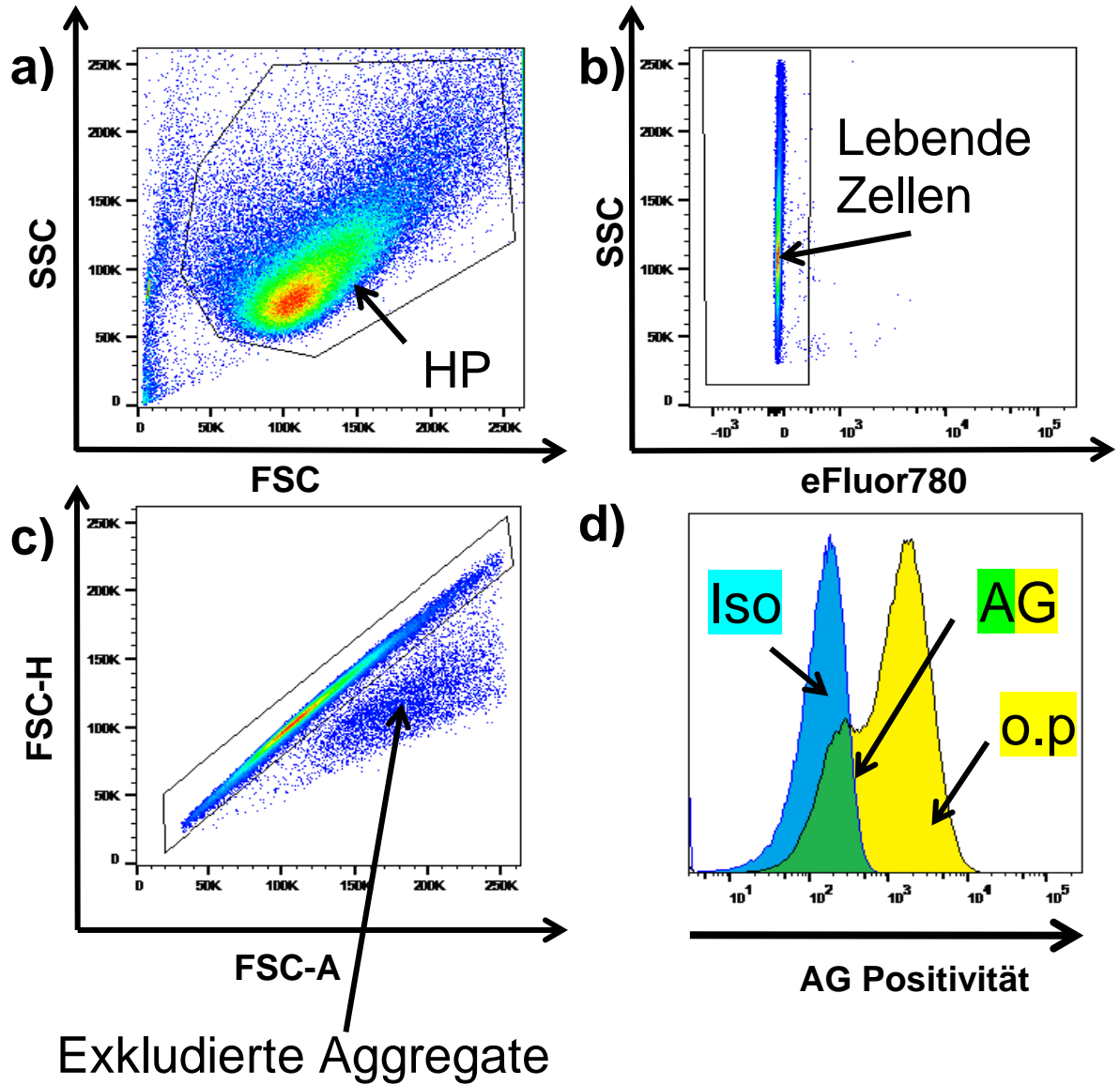


Abbildung 3: Prinzip der Auswertung durchflusszytometrischer Messungen

a) Die Umrandung (Gate) wurde im SSC (y-Achse) /FSC (x-Achse) Punktdiagramm um die Hauptpopulation (HP) gelegt, um nekrotische Zellen und Debris zu exkludieren. **b)** Die zuvor inkludierten Zellen wurden auf Positivität für den Apoptose Marker eFluor780 getestet (Positiv in x-Richtung). Die viablen Zellen befinden sich im Gate, das anhand von Lebend-/Totkontrollen gesetzt wurde. **c)** FSC-H (y-Achse) und FSC-A (x-Achse) wurden miteinander verglichen. Einzelzellen bilden eine lineare Population und befinden sich im Gate. **d)** Vereinfachte Darstellung der Auswertung mit FlowJO: Der Peak um die blaue und grüne Fläche stellt die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle dar (Iso). Die zweigipflige Linie, um die grüne und gelbe Fläche, stellt die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen dar. Die Grüne Fläche wird als negativ gewertet, da sie sich mit der Kontrolle (Iso) überschneidet. Die gelbe Fläche wird von der Software durch einen Algorithmus berechnet und als overton positive (o.p.) angegeben.

2.8.3 Transduktionskontrolle der Tumorzelllinien

Die fünf kommerziellen Brustkrebszelllinien MDA-MB-468, HS578T, BT549, MCF7, T47D wurden mit einem Luciferase-Gen transduziert. Durch eine äquimolare Koexpression eines fluoreszierenden Proteins (GFP oder mCherry) konnte die Luciferase-Expression indirekt, durchflusszytometrisch bestimmt werden. Vier Passagen nach der Transduktion (s.2.7, S.25), erfolgte durch eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), die Isolation erfolgreich transduzierter Zellen. Nach weiteren vier Passagen wurde die Expression erneut überprüft.

2.8.4 Antigenscreening der Tumorzelllinien

In dieser Arbeit wurde ein Antigenscreening für alle verwendeten Brustkrebszelllinien durchgeführt. Nach einer Literaturrecherche wurde ein Panel aus 12 krebs- und krebstammzellassozierten Antigenen zusammengestellt (s. S. 21). Der Nachweis der AG-Expression erfolgte durchflusszytometrisch, mittels Sekundärfärbung. Als PrimärAK wurden biotinylierte AK verwendet, wie sie später auch als Adaptermoleküle in den Zytotoxizitätsversuchen eingesetzt wurden (s. Tabelle 8). Als Sekundär-AK dienten Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierte anti-Biotin-AK. Anhand der Fluoreszenzwerte im FITC Kanal erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Antigenexpression (s. S.27). Für jede Zelllinie wurde die Färbung (Protokoll s. Anhang S.75, 6.1.3) in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Um apoptotische Zellen exkludieren zu können, wurde eine lebend/tot Färbung mit eFlour780 durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet an freie Aminosäuren, die sich hauptsächlich im Zellinneren befinden. Nekrotische Zellen mit beschädigter Zellmembran, färben sich mit eFlour780 stark an. Als Totkontrolle dienten hitzeinaktivierte Zellen derselben Zelllinie. Als weitere Kontrollen dienten 1. ungefärbte Zellen, 2. mit einem primär-AK gegen ein irrelevantes Antigen gefärbte Zellen (Isotyp, s. Abbildung 3) und 3. nur mit dem sekundär-AK gefärbte Zellen.

2.9 CAR-T-Zell Herstellung

2.9.1 T-Zell Isolierung aus dem Vollblut gesunder Spender

Die bei dieser Arbeit verwendeten T-Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Hypaque [39] aus dem heparinisierten Vollblut vier gesunder Spender isoliert (Protokoll s. Anhang 6.2, ab S. 77). Die Entnahme von 100-200 ml Vollblut erfolgte durch die Punktion einer peripheren Vene.

2.9.2 T-Zell Anreicherung durch Magnetaktivierte Zellsortierung (MACS)

Die magnetaktivierte Zellsortierung (MACS) wurde an Tag 0 zur T-Zell Isolierung und an Tag 7 zur AdCAR-T-Zell Anreicherung eingesetzt. Für die Separation mittels MACS wurden kleine, magnetisierbare Eisenpartikel, sogenannte „ferromagnetische Microbeads“ (MB), verwendet. Sie waren mit AK gegen CD4, CD8, oder LNGFR konjugiert. AG positive Zellen konnten durch eine Antigen-AK Bindung mit den MB markiert werden. Die Zellsuspension wurde nach der Inkubation mit MB durch eine Magnetsäule geleitet. In der Säule wurden die markierten Zellen fixiert. In weiteren Schritten konnte man sowohl mit den positiv selektionierten (markierten) Zellen, als auch den negativ selektionierten (nicht markierten) Zellen weiterarbeiten. In dieser Arbeit wurden mit anti-CD8 AK konjugierte MB verwendet, um aus den PBMC die CD8+ Zellen positiv zu selektionieren (Protokoll s. Anhang 6.2, ab S. 77). Aus den nicht markierten Zellen wurden anschließend, mit anti-CD4 MB, die CD4+ Zellen positiv selektioniert. Für die Anreicherung LNGFR+ Zellen wurden anti-LNGFR MB verwendet.

2.9.3 T-Zell Transduktion und Expansion

In vivo werden T-Zellen in der Regel durch einen Antigenkontakt zur Expansion angeregt. In dieser Arbeit wurden die T-Zellen nach der Isolation mit TransAct stimuliert (Protokoll s. Anhang 6.2, ab S. 77). Dabei handelte es sich um einen Nanomatrix, die an CD3 und CD28 bindet. Dies simulierte einen Antigenkontakt und führte zu einer Aktivierung der T-Zellen.

An Tag 1, 24h nach der Stimulation, wurden die T-Zellen mit Hilfe lentiviraler Vektoren (s. Kapitel 2.5, S. 24) transduziert. Sie integrierten das AdCAR-Gen in das Genom der T-Zellen. Eine Kontrollpopulation wurde bis auf die Transduktion analog behandelt und expandiert (Protokoll s. Anhang 6.2, ab S. 77). Diese MOCK-T-Zellen (von engl. Mock = Schein) dienen z.B. als Kontrollpopulation für die durchflusszytometrischen Färbungen.

2.9.4 Ermittlung der Transduktionseffizienz

Der Transduktionserfolg wurde ab Tag 7 mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Protokoll s. Anhang 6.2, ab S. 77). Als Kontrolle dienten MOCK T-Zellen. Der „low-affinity nerv growth factor receptor“ (LNGFR) wird von herkömmlichen T-Zellen nicht exprimiert. Nur die erfolgreich transduzierten Zellen exprimieren LNGFR und den AdCAR äquimolar. LNGFR dient somit als indirekter Nachweis für den Transduktionserfolg. Die Intensität gefärbter Mock-T-Zellen (Abbildung 4a) und transduzierter CAR-T-Zellen (Abbildung 4b) wurde durchflusszytometrisch gemessen. Durch den Vergleich mit den Messergebnissen der MOCK T-Zellen wurde der LNGFR-positive Anteil der transduzierten T-Zellen ermittelt. Die LNGFR-positiven Zellen liegen in der Umrandung. Bei der Auswertung wurde außerdem der CD4/CD8 Quotient innerhalb dieser Population gemessen (Abbildung 4c).

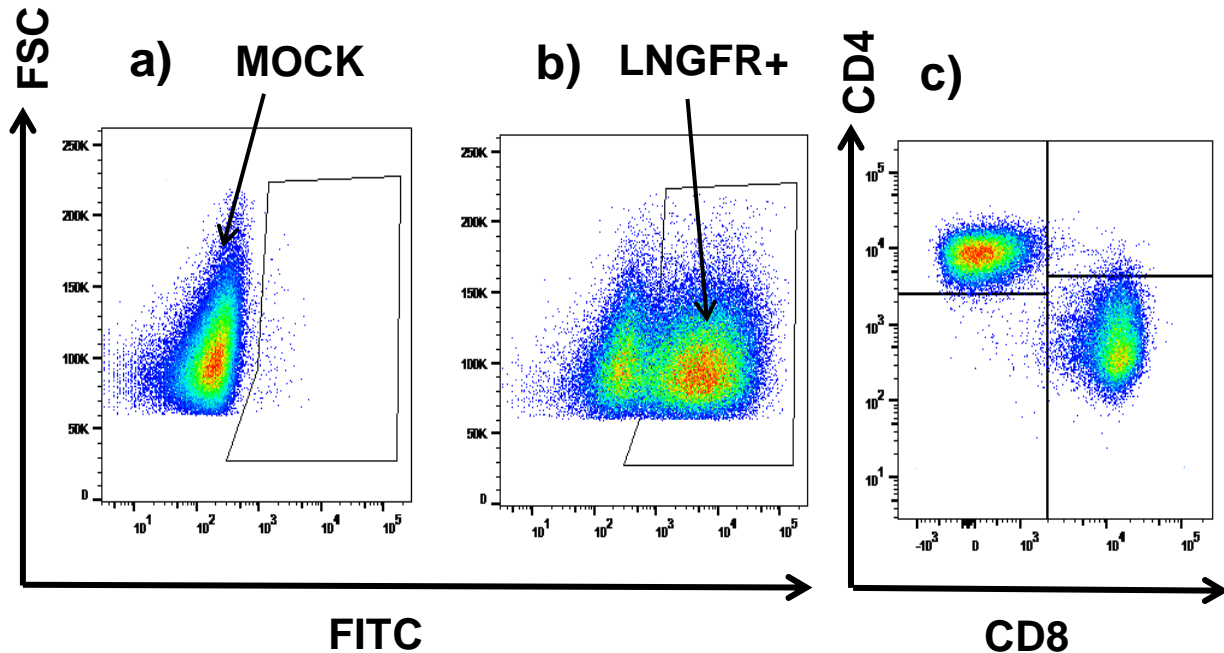


Abbildung 4: Auswertung des Transduktionserfolges

a) Die Zellgröße (FSC, y-Achse) ist in einem Punktdiagramm gegen die Positivität für LNGFR (FITC, x-Achse) aufgetragen. LNGFR-negative MOCK T-Zellen dienen als Kontrolle. b) Achsen wie in Abbildung 4a. In das Gate projizieren sich die LNGFR positiven Zellen, einem Antigen, das mit dem AdCAR koexprimiert wird. Es handelt sich um CAR-T-Zellen. c) In diesem Punktdiagramm sind die LNGFR+ Zellen aus der Abbildung 4b dargestellt. In y-Richtung ist die Positivität für CD4, in x-Richtung die Positivität für CD8 aufgetragen. In den Quadranten links oben projizieren sich die CD4+ CAR-T-Zellen und in der rechts unten die CD8+ T-Zellen.

2.10 Zytotoxizitätsversuche

2.10.1 Normalisierung der Effektorzellen

Die Verwendung von T-Zell Populationen mit einem unterschiedlichen AdCAR-T-Zell Anteil hätte den Vergleich der Versuche erschwert. Darum wurden die T-Zell Populationen auf einen immer gleichen AdCAR-T-Zell Anteil normalisiert. Da der Anteil an AdCAR-T-Zellen nach MACS bei allen Spendern zuverlässig über 60 % lag, wurde dieser Prozentsatz als Ziel der Normalisierung gewählt. Nach der LNGFR MACS und der Bestimmung LNGFR+ Zellen wurden die Populationen durch die Zugabe von MOCK-T-Zellen derselben Expansion auf 60 % AdCAR-T-Zell Anteil normalisiert.

2.10.2 Versuchsaufbau und Prinzip der Zytotoxizitätsversuche

Bei den durchgeführten Zytotoxizitätsversuchen wurden Tumorzellen (Zielzellen) mit AdCAR-T-Zellen (Effektoren) inkubiert. Am Ende dieses Zeitraumes wurde die Anzahl vitaler Tumorzellen innerhalb der Testpopulationen mit der einer Kontrollpopulation verglichen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zytotoxizitätsversuche verwendet. Die Viabilität der Zellen wurde bei dem xCelligence Assay durch Messung der Impedanz, bei dem Luciferase-kill-Assay durch Messung der Biolumineszenz gemessen. Als Effektoren dienten AdCAR-T-Zellen. Als Zielzellen dienten die in Absatz 2.4 beschriebenen Brustkrebszelllinien. Diese wurden zu Beginn der Versuche in 96 Kv Zellkulturplatten pipettiert. Soweit nicht anders beschrieben, wurden von den großzelligen Zelllinien BT549, HS578T und MC-1 20000 Zellen pro Kv verwendet, von allen anderen Zelllinien 30000 pro Kv. Als Versuchsmedium wurde die zur Zellpflege der jeweiligen Zelllinien übliche Stammlösung verwendet. Die Tumorzellen wurden in Kontroll- und Versuchsgruppen aufgeteilt. Soweit nicht anders angegeben wurden pro Gruppe je drei Kavitäten benutzt. Das Verhältnis der Effektorenzahl zur Tumorzellzahl in einer Kv wurde als E:T Verhältnis angegeben. Die nachfolgend aufgelisteten Kontrollgruppen wurden benötigt um unspezifische Wirkungen der Effektoren auf die Tumorzellen zu zeigen, z.B. eine unspezifische Lyse oder Wachstumshemmung durch Zytokinproduktion, Alloreaktivität, oder Nährstoffkonkurrenz:

- a. Tumorzellen allein
- b. AdCAR Kontrolle: Tumorzellen + AdCAR-T-Zellen (keine AK)
- c. Isotyp Kontrolle: Tumorzellen + AdCAR-T-Zellen mit REAcontrol AK

Der Kontroll-AK („REA-Kontrolle“) war ebenfalls biotinyliert und gegen ein nicht exprimiertes, irrelevantes AG (Hämocyanin der Schlitzschnecke) gerichtet.

Eine Reduktion der Tumorzellen in den Konditionen b und c im Vergleich zur Kontrollgruppe, wurde als unspezifische Lyse bezeichnet. Jede weitere Reduktion

der Tumorzellzahl in den Versuchsgruppen wurde als spezifische Lyse durch eine T-Zell Aktivierung mittels AdCAR erklärt. Um die spezifische Lyse zu messen wurde für jedes Antigen in der zuvor beschriebenen Antigenliste eine Kondition mit Tumorzellen, AdCAR und dem jeweiligen biotinylierten AK beobachtet. Für die Berechnung der spezifischen Lyse wurden die Werte anhand derer des Isotyps normalisiert. Hierfür wurde folgend Formel verwendet:

Formel 1: Berechnung der spezifischen Lyse anhand der Viabilitätswerte

$$\left(1 - \left(\frac{\text{Viabilität Adapter [\%]}}{\text{Viabilität Isotyp [\%]}} \right) \right) \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]}$$

2.10.3 Biolumineszenz-basierte Methode

Für diese Methode wurden die Tumorzelllinien mit einem Luciferase codierendes Gen transduziert (siehe Absatz 2.7, Seite 25). Das Enzym Luciferase katalysiert die intrazelluläre Oxidation von D-Luciferin. Für diese Reaktion wird ATP benötigt. Das Produkt Oxyluciferin befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand. Bei der Rückkehr aus diesem Zustand gibt es ein Photon ab. Dieses Licht kann mit hochsensiblen Kameras aufgefangen werden. Da ATP nur in lebenden Zellen zur Verfügung steht, produzieren auch nur vitale Zellen Licht. Abgestorbene Zellen leuchten nicht [40]. Die Intensität des aufgefangenen Lichts ist also proportional zur Anzahl lebender Zellen. Bei dieser Methode sollte keine quantitative Zellzahlbestimmung erfolgen. Es wurde die Biolumineszenz einer Testpopulation relativ zu den Kontrollpopulationen gemessen. Um das Verhältnis zwischen Lichtintensität und relativer Zellzahl zu zeigen beinhaltete jeder Versuch eine Zellzahltitration. In je drei Kavitäten wurden 100% 75% 50% 25% 10% und 0% der Gesamtzellzahl ausgesät (s. Abbildung 5). Die Titration zeigte unter

Berücksichtigung des für den Ansatz individuellen Wachstums, die Leuchtkraft bei entsprechender prozentualer Viabilität zu jedem Zeitpunkt. Weitere Kontrollen mit 100% der Gesamtzellzahl wurden an den Rändern der Platte angesetzt. Sie zeigten, ob sich die Bedingungen während der Messung (Abkühlung und Alkalisierung des Mediums) auf die Lichtintensität auswirkten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100% Kontrolle	CD47		MICA/B			100% Kontrolle	100% Kontrolle			100% Kontrolle	
B		CD66		ROR1				75% Kontrolle				
C		CD112		SSEA4				50% Kontrolle				
D		CD133		HER2				25% Kontrolle				
E		CD146		EGFR				10% Kontrolle				
F		CD171						0% Kontrolle				
G		CD276						ISO				
H		CD326						aCAR				

Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der Luciferase basierten AdCAR-T-Zell Versuche

Gelbe Felder: Es sind die verschiedenen Testpopulationen markiert. In jeweils drei Kavitäten befand sich der gleiche Versuchsansatz. Diese Kavitäten beinhalten Tumorzellen, AdCAR-T-Zellen und Adaptermoleküle. Die Beschriftung zeigt das Zielantigen der Adapter. **Dunkelgrüne Felder: H9-11** Tumorzellen wurden mit AdCAR-T-Zellen inkubiert, um die unspezifischen Effekte der AdCAR-T-Zellen auf Tumorzellen zu messen. **G9-11:** Tumorzellen wurden mit AdCAR-T-Zellen und einem Kontrollantikörper gegen ein nicht exprimiertes Antigen (Hämocyanin der Schlitzschnecke) inkubiert. Hellgrüne Felder: Kontrollen (nur Tumorzellen) um artifizielle Veränderung der Biolumineszenz (z.B. durch Auskühlen der Platte) während der Messung zu kalkulieren. **Blaue Felder:** Eine lineare Titration der verwendeten Tumorzellzahl ermöglicht es, jeder Lichtintensität einen relativen Viabilitätswert zuzuordnen.

2.10.4 Auswertung der Biolumineszenz-basierten Methode

Die Platten wurden für 48h im Zellinkubator aufbewahrt und 12h, 24h, 36h und 48h nach Ansetzen des Versuches im Plattenlesegerät (Viktor 1420 Multilabel Counter) gemessen. Die Lichtintensität jeder Kv wurde eine Sekunde lang gemessen und in Zählheiten angegeben. Um die Zählheiten in Viabilitätswerte umzurechnen wurden sie in eine zuvor angefertigte Auswertemaske (Excel-Datei) exportiert.

In dieser wurde zuerst auf eine artifizielle Veränderung der Leuchtkraft während der Messung getestet. Mit Hilfe einer linearen Funktion durch die Messpunkte der 100% Kontrollen (Reihen 1 und 12, s. Abbildung 5) wurde die Ab- oder Zunahme der Leuchtkraft insgesamt und innerhalb eines Messschrittes analysiert. Die kalkulierte Veränderung wurde aus den einzelnen Messwerten herausgerechnet, wodurch sich korrigierte Werte ergaben. Durch die korrigierten Werte der Titration wurde eine Eichgerade gelegt um jedem korrigierten Wert der Lichtintensität eine relative Zellviabilität zuzuordnen. Daraus berechnete sich für jede Kv ein relativer Viabilitätswert. Mit Excel wurde die spezifische Lyse mit Formel 1 (s. Kap. 2.10.2) berechnet. Aus den spezifischen Lysen der drei zusammengehörenden Kv wurden mit der Software GraphPad Prism 7 Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Versuchsansätze berechnet und Grafiken erstellt.

2.10.5 Zelladhärenz basierte Methode

Für die Zelladhärenz basierten Versuche in dieser Arbeit wurde das RTCA xCELLigence System von Roche verwendet. Bei den verwendeten E-Plate 96 Kv Platten dieses Herstellers befinden sich Mikroelektroden am Boden jeder Kavität. In festgelegten Intervallen konnte eine elektrische Spannung zwischen diesen Elektroden angelegt und somit der Widerstand zwischen ihnen gemessen werden.

Adhärente Tumorzellen setzen sich durch aktive Proteinbindungen am beschichteten Zellkulturboden und somit auf und zwischen den Mikroelektroden fest. Durch ihre lipidhaltige Zellmembran isolieren die Zellen die Elektroden teilweise voneinander. Mit zunehmender Anzahl der am Boden festgesetzten Zellen steigt der elektrische Widerstand. Sobald adhärenz Zellen absterben, lösen sie sich wieder von ihrem Untergrund und gehen in Suspension, wodurch der elektrische Widerstand zwischen den Mikroelektroden wieder sinkt.

Nach benetzen der Kv Böden mit 50 μ l Versuchsmedium konnte „Hintergrundwiderstand“ des Versuchsaufbaus (Kabel, Elektroden,

Zellkulturmedium etc.) gemessen werden. Der nach Abzug des Hintergrundwiderstandes resultierende elektrische Widerstand ist proportional zur Anzahl lebendiger Zellen. Als Versuchsmedium wurde die zur Zellpflege der jeweiligen Zelllinie übliche Stammlösung verwendet.

In einem zweiten Schritt wurden die Tumorzellen in einem Volumen von 50 µl und weitere 100 µl Versuchsmedium hinzugefügt. Dann wurde die Messung des Widerstandes in 15-minütigen Intervallen begonnen. Bei den verwendeten Zelllinien war nach 24h die Anwachsphase abgeschlossen. Dann konnten je nach Gruppe die Effektoren, Adaptermoleküle oder nur Versuchsmedium hinzugegeben werden. Eine Gruppe bestand, soweit nicht anders angegeben, aus 3 Kavitäten mit einem Endvolumen von jeweils 200 µl. Die Auswirkung der Effektoren wurde über weitere 48h beobachtet. Insgesamt wurde bei den durchgeführten Versuchen also über mindestens 72h, alle 15 Minuten, die Impedanz gemessen. Somit konnte in Echtzeit eine Kinetik des Zellwachstums bzw. der Lyse erstellt werden.

2.10.6 Auswertung der Zelladhärenz basierten Methode

Die Auswertung erfolgte nach einer Normalisierung auf den Messwert zum Zeitpunkt direkt nach der Zugabe der Effektoren. Für jede Kv wurde der zu diesem Zeitpunkt gemessene, individuelle elektrische Widerstand als 100 % Viabilität definiert. Jede Änderung wurde von der Software in Prozent, relativ zu diesem Messwert angegeben. Die Viabilitätswerte wurden in eine Exceldatei exportiert. Mit Excel wurde die spezifische Lyse nach 48h mit Formel 1 (s. Kap. 2.10.2) berechnet. Aus den spezifischen Lysen der drei zusammengehörenden Kv wurden mit der Software GraphPad Prism 7 der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und Grafiken erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Herstellung Luciferase exprimierender Zelllinien

Die Punktdiagramme (Abbildung 6) zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Transduktionskontrolle der verwendeten Tumorzelllinien. Gemessen wurde die Positivität der Zellen für die Fluorochrome GFP bzw. mCherry. Sie wurden von den transduzierten Zellen äquimolar zu dem Enzym Luciferase koexprimiert. Dadurch konnte die Luciferaseexpression indirekt nachgewiesen werden. Die transduzierten und selektierten Zellen (schwarze Punkte) wurden jeweils im Vergleich zu einer nicht transduzierten Kontrolle (graue Punkte) der gleichen Zelllinie gemessen. Die Zelllinien MDA-MB-468 und BT549 wurden mit dem Luciferase-GFP (Luc-GFP) Plasmid transduziert, die Zelllinien HS578T, MCF7 und T47D mit Luc-mCherry. Bei allen Zelllinien waren die jeweiligen Populationen deutlich voneinander abgrenzbar. Nur bei der Zelllinie BT549 bestand bei 2% der transduzierten Population noch eine Überlappung mit der Kontrollpopulation (98% Luc-GFP positiv), während sich die Populationen bei den restlichen Zelllinien zu 0% überlappten (100% Luc-GFP/Luc-mCherry positiv). Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der transduzierten Zellen und der Kontrollpopulation wurden verglichen. Bei den verwendeten Zellen lagen die MFIR zwischen mindestens 52 (T47D, s. Abbildung 6c) und maximal 1544 (MDA-MB-468, s. Abbildung 6a). Es war von einer stabilen und ausreichenden Luciferase-Expression, für die Verwendung in Luciferase basierten Zytotoxizitätsversuchen, auszugehen.

Ergebnisse

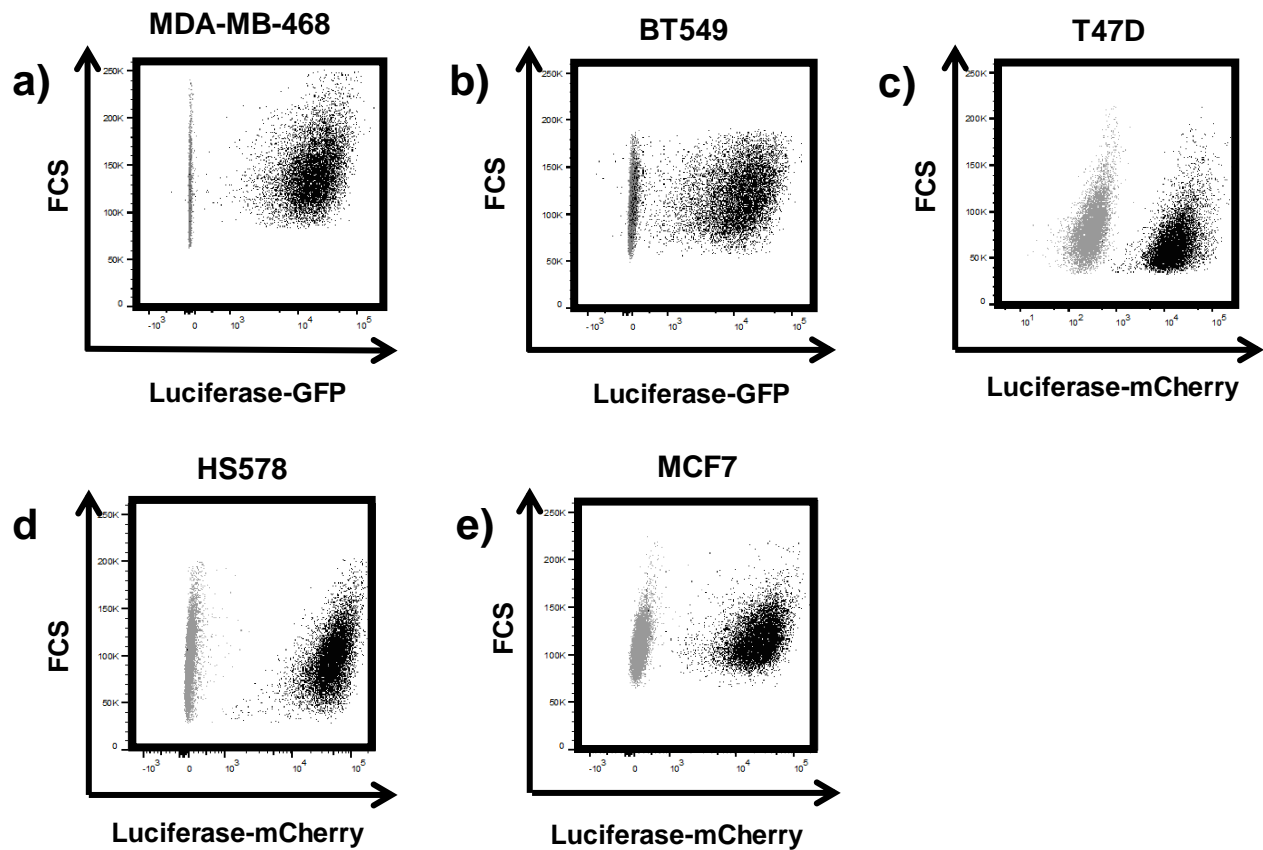


Abbildung 6: Nachweis der Luciferaseexpression der transduzierten Zelllinien

a-e: Die Punktdiagramme zeigen die durchflusszytometrische Transduktionskontrolle der Tumorzelllinien. Luciferase und die fluorochrome GFP (LUC-GFP) bzw. mCherry (LUC-mCherry) wurden äquimolar koexprimiert. GFP, oder mCherry positive Zellen wurden als Luciferase positiv gewertet. In y-Richtung ist die Zellgröße (FCS) und in x-Richtung die Positivität für das jeweilige koexprimierte, fluoreszierende Protein (s. Achsenbeschriftung) aufgetragen. **Schwarze Population:** Diese Population besteht aus den mit LUC-GFP oder LUC-mCherry transduzierten Zellen der jeweiligen Zelllinie (s. Überschriften). **Graue Population:** Diese Population besteht aus nicht transduzierten Zellen der jeweiligen Zelllinie (s. Überschriften). Die Auswertung der transduzierten Population erfolgte im Vergleich zu dieser Population.

Tabelle 14: Messergebnisse zu Abbildung 6

MFI = Mediane Fluoreszenzintensität

	Zelllinie	Kontrolle	Transduzierte Zellen	MFIR	Positiv in %
a	MDA-MB-468	MFI: 12	MFI: 17904	1544	100
b	BT549	MFI: 84	MFI: 11746	141	98
c	T47D	MFI: 300	MFI: 15633	52	100
d	HS578T	MFI: 121	MFI: 46985	388	100
e	MCF-7	MFI: 209	MFI: 24450	117	100

3.2 Immunphänotypisierung und Antigen screening der Tumorzellen

Die Ergebnisse des Antigen screenings zeigten ein heterogenes Expressionsmuster. Die Daten sind in Abbildung 7a und b in Form einer Heatmap dargestellt.

Die Antigene CD47, CD276 und EGFR wurden von nahezu der gesamten Population aller sechs Zelllinien exprimiert. Die Mediane Fluoreszenz Intensitätsratio (MFIR) für diese AG unterschied sich zwischen den Zelllinien jedoch stark. Bei dem AG EGFR zeigte sich das sehr deutlich. Die Expression (Overton-positiv, s. Abbildung 3) war bei allen sechs Brustkrebszelllinien bei über 90% (s. Abbildung 7a). Die MFIR Werte (Abbildung 7b) lagen zwischen dem 7,5- und 243,8 -fachen der Autofluoreszenz.

Die Antigene CD66 und SSEA4 sind Beispiele für Antigene, deren Expression nur auf einzelnen Zelllinien hoch war.

CD326 (EpCAM), ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, war auf vier der sechs Zelllinien zu 100% und mit einer MFIR von 239,3 bis 307,1 sehr hoch exprimiert. Die mesenchymal differenzierten, claudinarmen Brustkrebszelllinien BT549 und HS578T, exprimierten CD326 nur gering bis mäßig und mit einer sehr niedrigen MFIR (s. Abbildung 7a-b).

Ergebnisse

a)

	MCF7	T47D	BT549	HSS578T	MC-1	MDA-MB-468
CD47	99%	100%	99%	99%	99%	100%
CD66	69%	21%	10%	3%	1%	97%
CD112	46%	99%	99%	96%	96%	100%
CD133	16%	13%	8%	2%	71%	76%
CD146	31%	43%	85%	84%	88%	90%
CD171	16%	37%	10%	51%	1%	9%
CD276	100%	100%	98%	94%	99%	99%
CD326	100%	100%	12%	3%	100%	100%
ROR1	93%	9%	29%	70%	77%	95%
SSEA4	17%	28%	21%	1%	62%	15%
Her2	99%	100%	75%	78%	81%	5%
EGFR	94%	90%	98%	97%	100%	100%

b)

	MCF7	T47D	BT549	HSS578T	MC-1	MDA-MB-468
CD47	47,3	86,1	22,7	21,5	54,5	46,9
CD66	2,8	1,2	1,1	1,0	1,0	17,6
CD112	1,8	11,4	11,1	8,1	6,8	17,3
CD133	1,2	1,2	1,1	1,0	6,8	5,5
CD146	1,5	1,8	5,8	6,5	10,1	16,5
CD171	1,2	1,6	1,1	2,2	1,0	1,1
CD276	72,8	45,1	21,9	59,4	22,6	40,8
CD326	307,1	285,6	1,1	1,0	241,3	239,3
ROR1	15,1	1,1	1,4	2,5	7,3	8,6
SSEA4	1,2	1,4	1,3	1,0	5,4	1,2
Her2	20,4	19,6	4,9	5,3	4,0	1,1
EGFR	30,1	7,5	27,0	30,3	87,1	243,8

Legende:	Sehr niedrig	niedrig	mäßig	mäßig-hoch	hoch	Sehr hoch
-----------------	--------------	---------	-------	------------	------	-----------

Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse des Antigenscreening der Brustkrebszelllinien als Heatmap

Abbildung 7 a und b) In den Heatmaps sind die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Antigenscreenings dargestellt. Jede Zelllinie (s. erste Zeile) wurde auf jedes Antigen des Panels (s. erste Spalte) getestet. Die Daten stellen Mittelwerte aus den Ergebnissen drei unabhängiger, durchflusszytometrischer Antigenfärbungen dar (n=3). Die Farben stellen die Messwerte, von Hellblau (sehr niedrig) bis Rot (Sehr hoch) dar (s. Legende). **a)** Zeigt die overton positiv Werte in Prozent (s. Abbildung 3:). **b)** Zeigt die MFI-Ratio zwischen der Probe und der Isotypkontrolle (s. 0.). Die Daten sind Einheitslos.

3.3 Charakterisierung des CAR-T-Zell Produkts

Für die Herstellung der in dieser Arbeit benötigten AdCAR-T-Zellen, wurden zwei Viruschargen hergestellt und verwendet. Die Transduktionseffizienz unterschied sich in Abhängigkeit der verwendeten Viruscharge und dem Spender. Sie lag bei mindestens 31% und maximal 80,3% (s. Abbildung 8). Um den Anteil an AdCAR-T-Zellen innerhalb der T-Zell Population zu erhöhen, wurden diese mittels MACS positiv selektioniert. Der Anteil an AdCAR-T-Zellen konnte durch diese Methode zuverlässig erhöht werden und lag bei 86,6 % und 95,9 % (s. Abbildung 9).

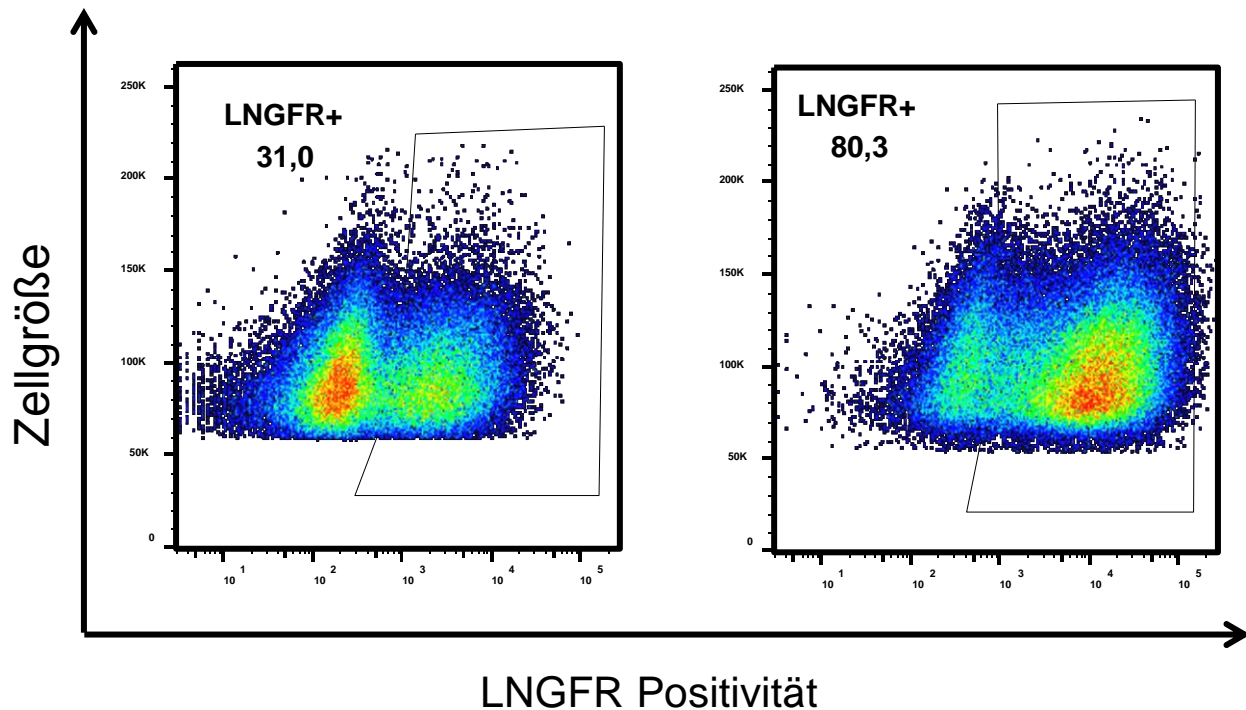


Abbildung 8: Minimaler und maximaler Transduktionserfolg der zwei verwendeten Viruschargen

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte AdCAR Expression lentiviral transduzierter T-Zellen. Der Nachweis erfolgte über die Anfärbung von LNGFR, welches äquimolar mit dem AdCAR koexprimiert wurde. Auf der y-Achse wird die Zellgröße linear aufgetragen, auf der x-Achse werden die Zellen nach ihrer Positivität für LNGFR aufgetragen. Das Gate wurde anhand einer nicht transduzierten Kontrollpopulation gesetzt. Zellen, die in das Gate fallen, werden als AdCAR positiv definiert. Die Expressionsrate/Transduktionseffizienz schwankte zwischen minimal 31 % (links) und maximal 80,3 % (rechts).

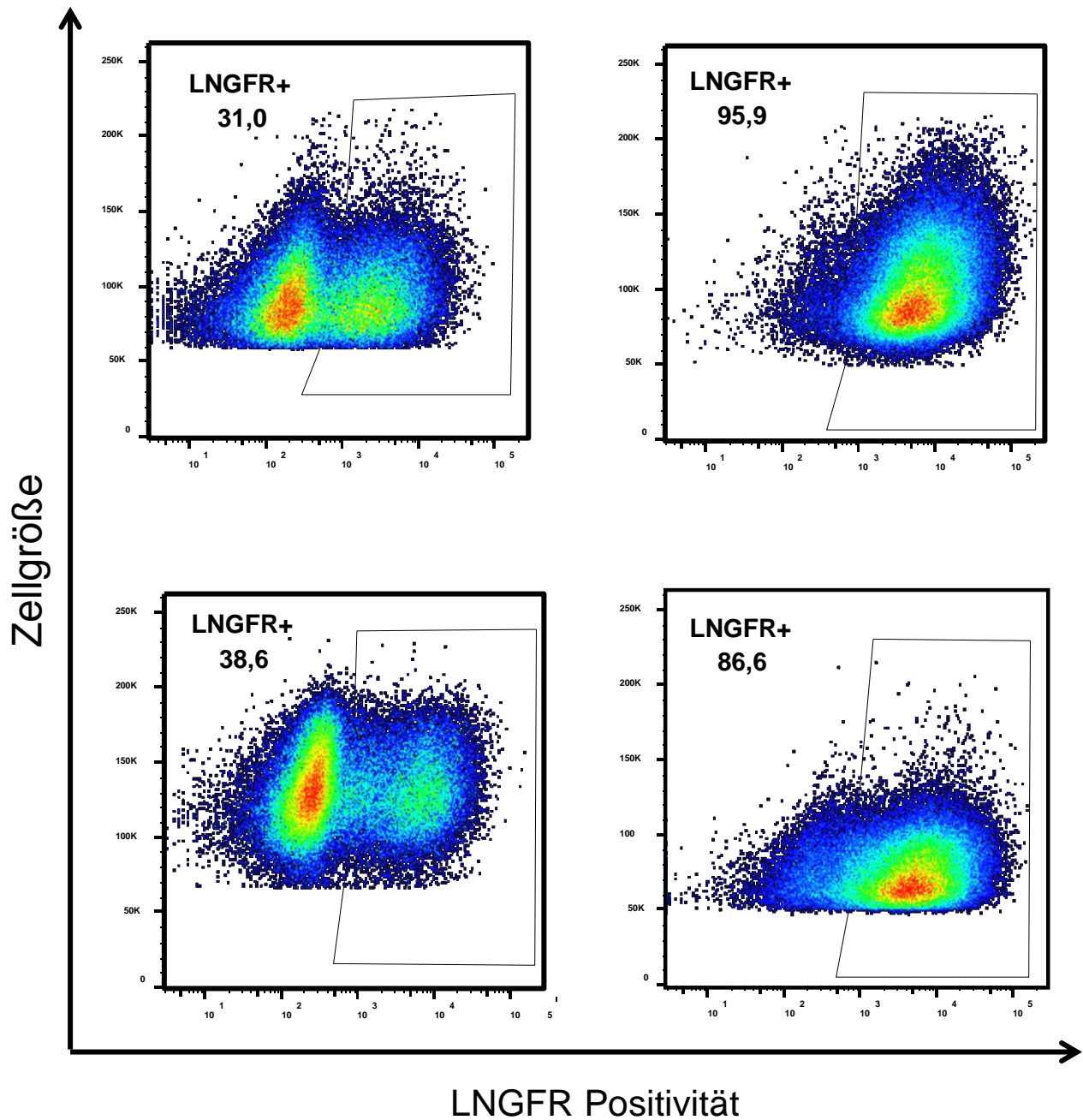


Abbildung 9: Ad-CAR-T Zell Anteil vor und nach MACS

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte AdCAR -Expression, lentiviral transduzierter T-Zellen. Der Nachweis erfolgte über die Anfärbung von LNGFR, welches äquimolar mit dem AdCAR exprimiert wurde. Auf der y-Achse wird die Zellgröße linear aufgetragen, auf der x-Achse werden die Zellen nach ihrer Positivität für LNGFR aufgetragen. Das Gate wurde anhand einer nicht transduzierten Kontrollpopulation gesetzt. Zellen, die in das Gate fallen, werden als AdCAR positiv definiert. **Links oben und unten:** Die Punktdiagramme auf der linken Seite zeigen T-Zell Populationen vor MACS. **Rechts oben und unten:** Die Punktdiagramme auf der rechten Seite zeigen die jeweiligen Populationen nach der Anreicherung LNGFR positiver Zellen mittels MACS.

3.4 Ausschluss unspezifischer Effekte durch Adapter und MOCK-T-Zellen

Um nur den Effekt der chimären Antigenrezeptoren in Kombination mit spezifischen Adaptern zu messen, mussten unspezifische Effekte von T-Zellen und AM an sich, und deren Kombination, ausgeschlossen werden. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse eines solchen Experiments mit der Zelllinie HS578T. Im Luciferase-Assay wurde die Viabilität einer Kontrollgruppe und drei Versuchsgruppen beobachtet.

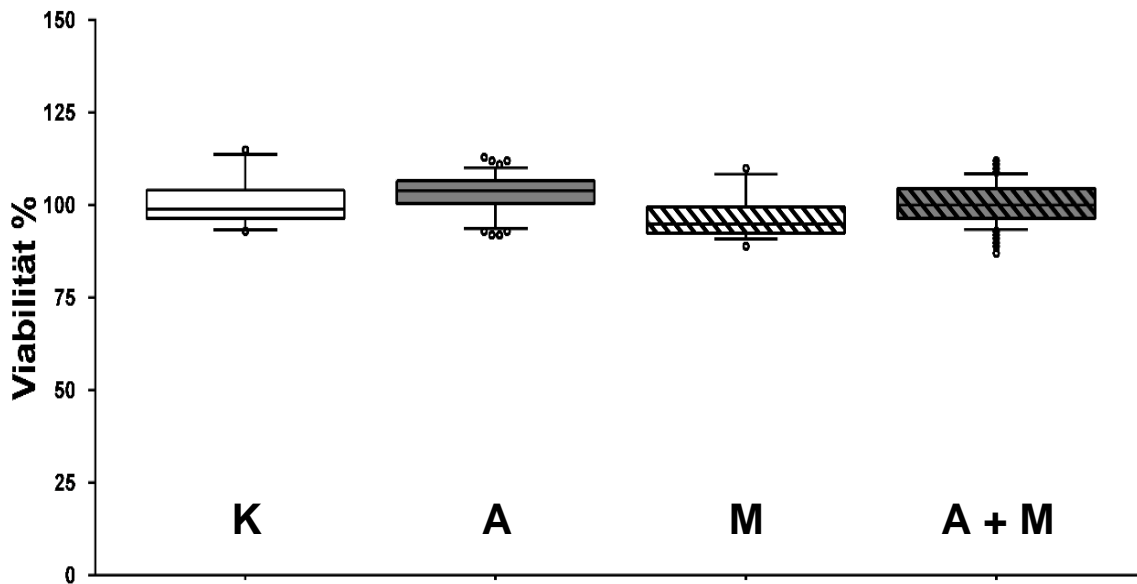


Abbildung 10: Adaptermoleküle und MOCK-T-Zellen verursachen bei Brustkrebszellen keine Lyse

Viabilität der Zelllinie HS578T in drei verschiedenen Luciferase-Versuchen (n=3). Die Daten sind als „Boxes and Whiskers“ dargestellt. **Gruppe K (weiß):** Dargestellt ist die Viabilität der Kontrollgruppe. Der Mittelwert (MW) beträgt 48 h nach Inkubation mit Zellkulturmedium 101 % (SD: 6,9 %). Die drei Testgruppen wurden mit der Kontrolle verglichen. **Gruppe A (grau):** Dargestellt ist die Viabilität nach 48h Inkubation mit Adaptermolekülen. Je Adapter wurden drei Kv angesetzt. Der MW der Viabilität beträgt 102,9 % (SD: 5,5 %). **Gruppe M (schwarz-weiß):** Dargestellt ist die Viabilität nach 48 h Inkubation mit MOCK-T-Zellen drei verschiedener Spender. Je Spender wurden zwölf KV angesetzt. Der MW der Viabilität beträgt 96,7 % (SD: 6,2 %). **Gruppe A+M (schwarz-grau):** Dargestellt ist die Viabilität nach 48h Inkubation mit MOCK-T-Zellen drei verschiedener Spender (D1-3). Je Spender und Adapter wurden drei KV angesetzt. Der MW der Viabilität beträgt 100,3 % (SD: 5,6 %). Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. nachfolgender Text).

Die Kontrollgruppe (K) wurde nur mit Versuchsmedium behandelt. Die Versuchsgruppe M wurde mit untransduzierten T-Zellen (MOCK) dreier unterschiedlicher Spender und die Gruppe A+M mit MOCK-T-Zellen drei verschiedener Spender in Kombination mit den 12 später verwendeten AM inkubiert. Nach 48 h wurde die Viabilität der drei Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe verglichen (s. Abbildung 10). Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism 7 und dem Kruskal Wallis Test durchgeführt. Als Nullhypothese galt, dass sich die Viabilität der Versuchsgruppen und der Kontrollgruppen unterscheidet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ unterstützte die Nullhypothese, ein p-Wert $> 0,05$ sprach dafür, dass kein signifikanter Unterschied bestand. Mit einem p-Wert von 0,47 (K vs. A), 0,21 (K vs. M) und $> 0,99$ (K vs. A+M) konnte jeweils kein signifikanter Unterschied der Viabilität festgestellt werden. Folglich konnte keine unspezifische Lyse durch MOCK-T-Zellen dreier unterschiedlicher Spender, der AM oder einer Kombination beider, gezeigt werden.

3.5 Vergleich der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methode

Für die Testung und Etablierung der „SPIIT“ wurden zwei unterschiedliche Zytotoxizitätsversuche verwendet. Die auf Impedanz basierende xCELLigence Methode und die auf Biolumineszenz basierende Luciferase Methode. Die Hypothese, dass die Werte für die spezifische Lyse beider Methoden vergleichbar sind, wurde bei Vorversuchen mit der Zelllinie MDA-MB-468 überprüft. Die Werte der spezifischen Lyse beider Methoden wurden graphisch (s. Abbildung 11: Vergleich der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden), und statistisch (s. Tabelle 15: Statistische Auswertung des Vergleichs der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden) miteinander verglichen.

Die Balken in Abbildung 11 stellen die Mittelwerte aus drei xCELLigence Versuchen mit drei unterschiedlichen Spendern (hellgrau-schwarz gestreift) bzw. mindestens drei Luciferase basierten Versuchen mit drei unterschiedlichen

Ergebnisse

Spendern, bestehend aus zwei technischen Replikaten je Versuch (dunkelgrau), dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Um die Unterschiede der zwei jeweils zu einem Antigen gehörenden Balken quantifizieren zu können, wurden alle Daten in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Statistische Auswertung des Vergleichs der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden

Zu jedem Antigen (Spalte 1) sind die Mittelwerte (MW) der in Luciferase (Luc) basierten Versuchen (n=3 mit drei verschiedenen Spendern und jeweils zwei technischen Replikaten) ermittelten Lysewerte (Spalte 2) und deren Standardabweichung (SD, Spalte 3) angegeben. Sie wurden mit den Mittelwerten (MW) der in xCELLigence Versuchen (n=3 mit drei verschiedenen Spendern) ermittelten Lysewerte (Spalte 4) und deren Standardabweichung (SD, Spalte 5) verglichen. Die Spalten 6-8 zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertung durch den Kruskal Wallis Test mit der Software GraphPad Prism 7. Die Nullhypothese lautete, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Luciferase basierten und der mittels xCELLigence Versuchen ermittelten Ergebnisse bestand. Ein p-Wert > 0,05 bedeutete, dass die Nullhypothese verworfen werden musste. Somit zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Spalte 7) zwischen den Lysewerten der verglichenen Methoden.

AG	MW Luc	SD Luc	MW xCELL	SD xCELL	Mean rank	Signifikant?	p-Wert
CD47	77,33	19,84	67,44	13,35	33,3	nein	0,38
CD66	66,75	11,78	53,78	15,26	33,3	nein	0,40
CD112	69,56	14,35	72,89	14,07	-11,3	nein	0,76
CD133	91,00	11,53	78,00	15,62	43,6	nein	0,23
CD146	57,63	21,49	57,33	14,02	9,5	nein	0,80
CD171	1,06	7,48	21,44	9,697	-32,0	nein	0,38
CD276	80,83	14,05	57,89	16,71	65,8	nein	0,10
CD326	103,3	8,47	96,44	5,725	25,1	nein	0,49
ROR1	78,89	14,26	77,56	6,146	3,1	nein	0,93
SSEA4	12,06	13,21	36,56	12,92	-36,8	nein	0,31
HER2	-9,06	10,44	11,44	9,475	-31,7	nein	0,39
EGFR	105	10,24	102,1	3,855	7,0	nein	0,85

Mit der Software GraphPad Prism 7 erfolgte die statistische Auswertung der Daten. Es wurde ein Kruskal Wallis mit der Nullhypothese, dass sich die Lysewerte beider Methoden für ein jeweiliges Antigen unterscheiden. Ein p-Wert $\leq 0,05$ unterstützte die Nullhypothese, ein p-Wert $> 0,05$ sprach dafür, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen bestand. Die Mittelwerte mit Standardabweichung für die Luciferase Assays, xCELLigence Assays und deren Differenz sind in den Spalten zwei bis fünf, von links nach rechts, angegeben. In den Spalten sieben und acht ist das Ergebnis der Signifikanztestung mit entsprechendem p Wert angegeben. Wie der Spalte acht zu entnehmen ist, musste die Nullhypothese bei allen verglichenen Antigenen verworfen werden. Somit unterschieden sich die Daten der normalisierten Lysewerte beider Methoden für keines der Antigene signifikant. Der größte Unterschied war zwischen den Daten für das Antigen CD276 (B7H3), ein Immuncheckpoint-Molekül, festzustellen. Hier lag der Unterschied der Mittelwerte bei 20 %. Unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichungen lag der p-Wert dennoch bei 0,10 und somit oberhalb, des für eine Signifikanz des Unterschiedes maximal möglichen p-Wertes, von $\leq 0,05$.

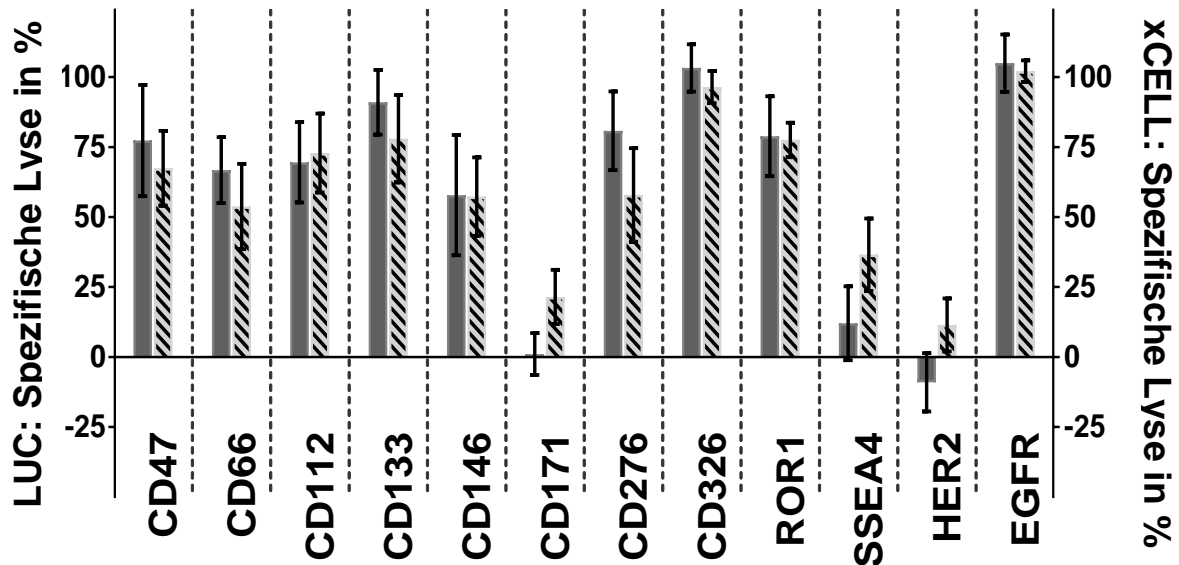


Abbildung 11: Vergleich der Luciferase- und Zelladhärenz basierten Methoden

Dargestellt ist die spezifische Lyse in Prozent (y-Achsen) der Zelllinie MDA-MB-468 durch AdCAR-T-Zellen der Spender D2-D4 in Kombination mit Adaptern, die für die auf der x-Achse gezeigten Antigene spezifisch waren. Die dunkelgrauen Balken (LUC = Luciferase Assays) beziehen sich auf die linke y-Achse, die grau-schwarz gestreiften Balken (xCELL = xCELLigence) auf die rechte y-Achse. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung in Prozent an. **Dunkelgraue Balken:** Die Balken zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse aus Luciferase Assays (n=3, mit drei verschiedenen Spendern, je zwei technische Replikate). **Grau-schwarze Balken:** Die Balken zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse aus xCELLigence Versuchen (n=3, mit drei verschiedenen Spendern).

3.6 Spezifische Lyse der Tumorzellen durch AdCAR-T-Zellen

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche ergaben für jede Zelllinie, in Kombination mit den Adaptermolekülen des Antigenpanels, zwölf spezifische Lysewerte. Für die Adaptermoleküle sollte eine Korrelation zwischen den Werten des Antigen screenings und der spezifischen Lyse, die sie in Kombination mit den AdCAR-T-Zellen auslösten, ermittelt werden. Zunächst wurden die Werte für jede Zelllinie verglichen. In der Abbildung 12 ist dieser Vergleich für die Zelllinie MDA-MB-468, in der Abbildung 13, der für die Primärkultur MC-1 dargestellt. Eine Übersicht über den Vergleich zwischen spezifischer Lyse und overton positiv zeigt

Abbildung 14, denjenigen zwischen spezifischer Lyse und MFIR, Abbildung 15. In den Abbildungen ist die spezifische Lyse (grüne Balken) und die Antigenexpression (blaue Balken) dargestellt. Die AG Expression ist in Abbildung 12a und Abbildung 13a sowie Abbildung 14 als Overton positive (o.p.) und in Abbildung 12b und Abbildung 13b sowie Abbildung 15 als MFIR dargestellt (s. 2.8.4, S.29).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine relevante Lyse stattfand, wenn sich im Screening eine Antigenexpression nachweisen ließ. Bei der Zelllinie MDA-MB-468 (s. Abbildung 12) konnte CD66 beispielsweise durch einen spezifischen Adapter auf 97 % (o.p., MW) der Population nachgewiesen werden. 67 % (MW) der Population wurden mit AdCAR-T-Zellen und den CD66 Adaptern innerhalb von 48h lysiert.

Die Zytotoxizität war dabei tatsächlich von der Expression des AG auf der Tumorzelle abhängig. Die Adapter lösten in Kombination mit AdCAR-T-Zellen ohne AG-Expression keine spezifische Lyse aus. Auf der Zelllinie MC-1 (s. Abbildung 13) konnten beim Antigen screening beispielsweise nahezu keine Bindung der CD66 Adapter nachgewiesen werden. Während der Zytotoxizitätsversuche fand durch die CD66 Adapter in Kombination mit Ad-CAR-T-Zellen auch keine spezifische Lyse statt (-7 % MW).

Die Zytotoxizität erfolgte dabei unabhängig von der Zelllinie und nur bei AG Expression. SSEA4 und HER2 spezifische Adapter konnten beispielsweise an der Zelllinie MC-1 auf 62 % (o.p. MW) und 81 % (o.p. MW) der Population binden und es fanden 85 % (MW) und 69 % (MW) spezifische Lyse statt. Auf der Zelllinie MDA-MB-468 konnten sie nur an 6,4 % (o.p. MW) und 4,6 % (o.p. MW) der Population binden und nur 12 % (MW) und -9 % (MW) spezifische Lyse auslösen.

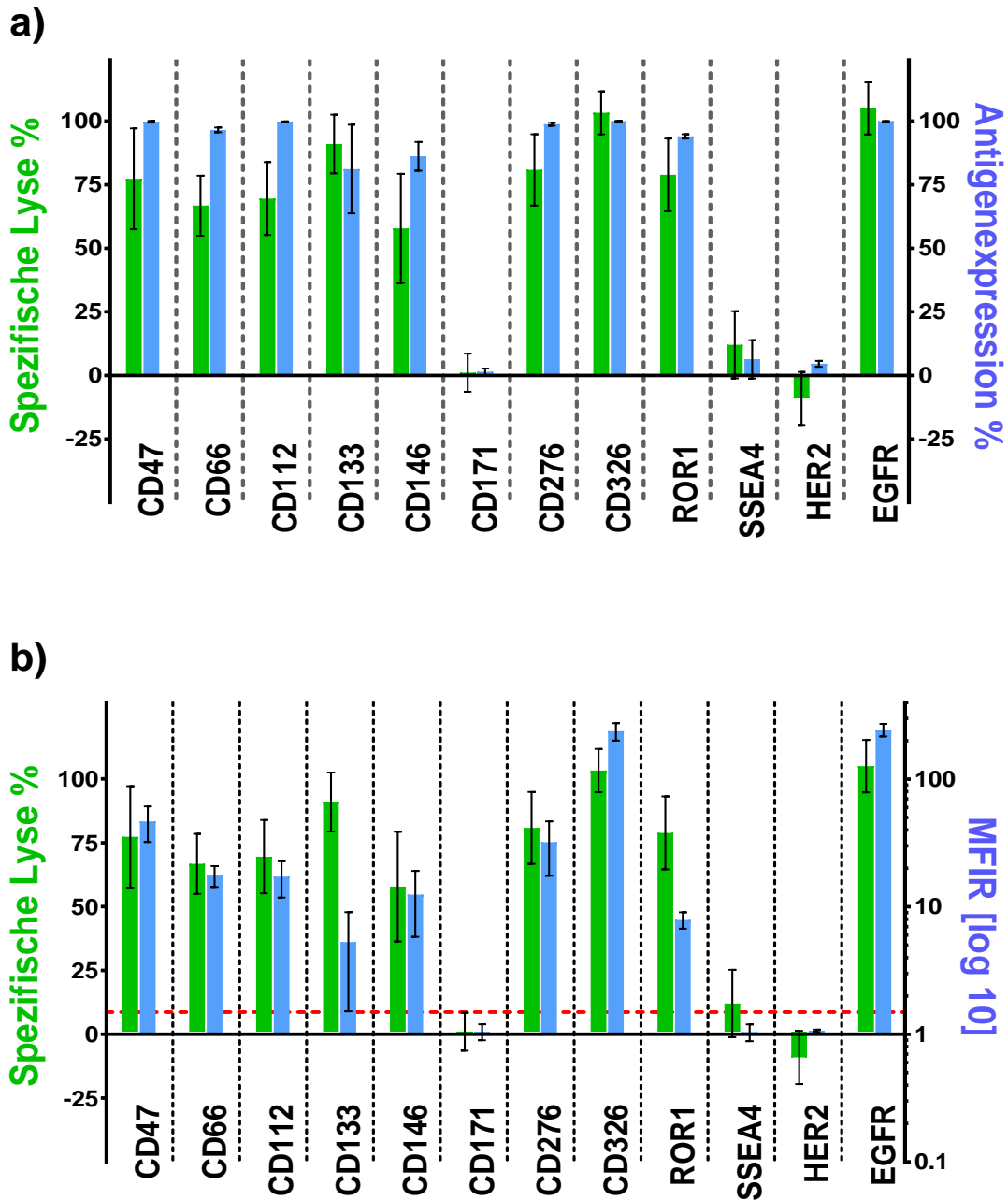


Abbildung 12: MDA-MB-468; Vergleich der spezifischen Lyse und AG-Expression

Abbildung 12 a und b): Ergebnisse für die kommerzielle Zelllinie MDA-MB-468. Die spezifische Lyse wurde mit den Werten des AG Screenings verglichen. Die grünen Balken beziehen sich auf die linke y-Achse, die Blauen auf die rechte. Die x-Achse zeigt das AG, das der für den Zytotoxizitätsversuch, oder die Färbung verwendete AM spezifisch band. **Grüne Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse [%]. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Die Lysewerte stammten aus Luciferase basierten Zytotoxizitätsversuchen (3 verschiedene Spender (n=3 mit je sechs technischen Replikaten) und einer E:T von 2:1. **Abbildung 12 a; blaue Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte dreier durchflusszytometrischer Messungen (Overton positiv [%]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an. **Abbildung 12 b; blaue Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte dreier durchflusszytometrischer Messungen (MFIR [log₁₀]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an.

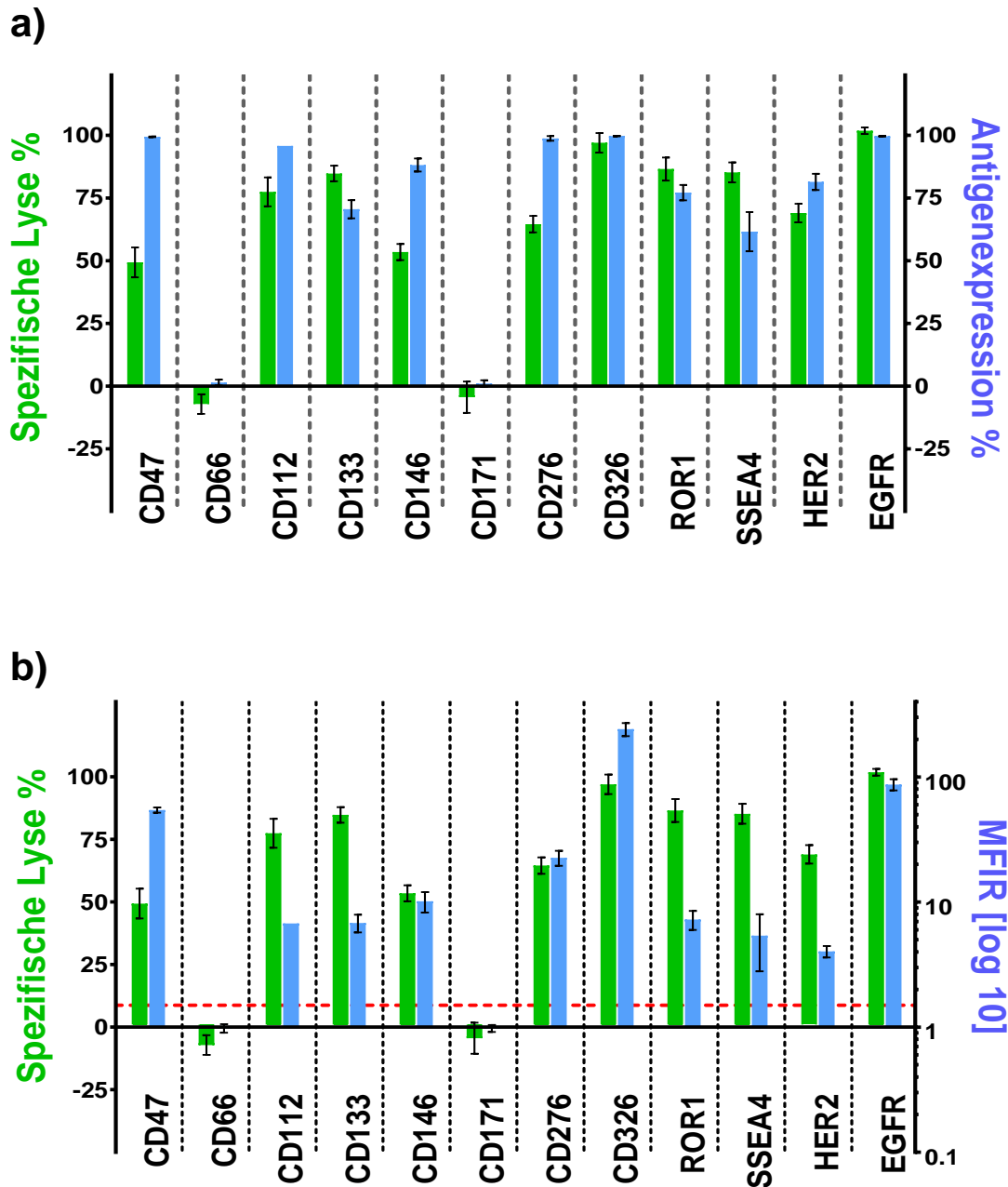


Abbildung 13: MC-1; Vergleich der spezifischen Lyse und AG-Expression

Abbildung 13 a und b): Ergebnisse für die aus einer Metastase gewonnenen Zelllinie MC-1. Die spezifische Lyse wurde mit den Werten des AG Screenings verglichen. Die grünen Balken beziehen sich auf die linke y-Achse, die Blauen auf die rechte. Die x-Achse zeigt das Antigen, das der für den Zytotoxizitätsversuch, oder die Färbung verwendete AM spezifisch band. **Grüne Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse [%]. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Die Lysewerte aus X-Celligence Versuchen (autologe AdCAR-T Zellen, n=3 E:T 1:1). **Abbildung 13 a; blaue Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte aus drei durchflusszytometrischen Messungen (Overton positiv [%]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an. **Abbildung 13 b, blaue Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte aus drei durchflusszytometrischen Messungen (MFIR [log₁₀]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an.

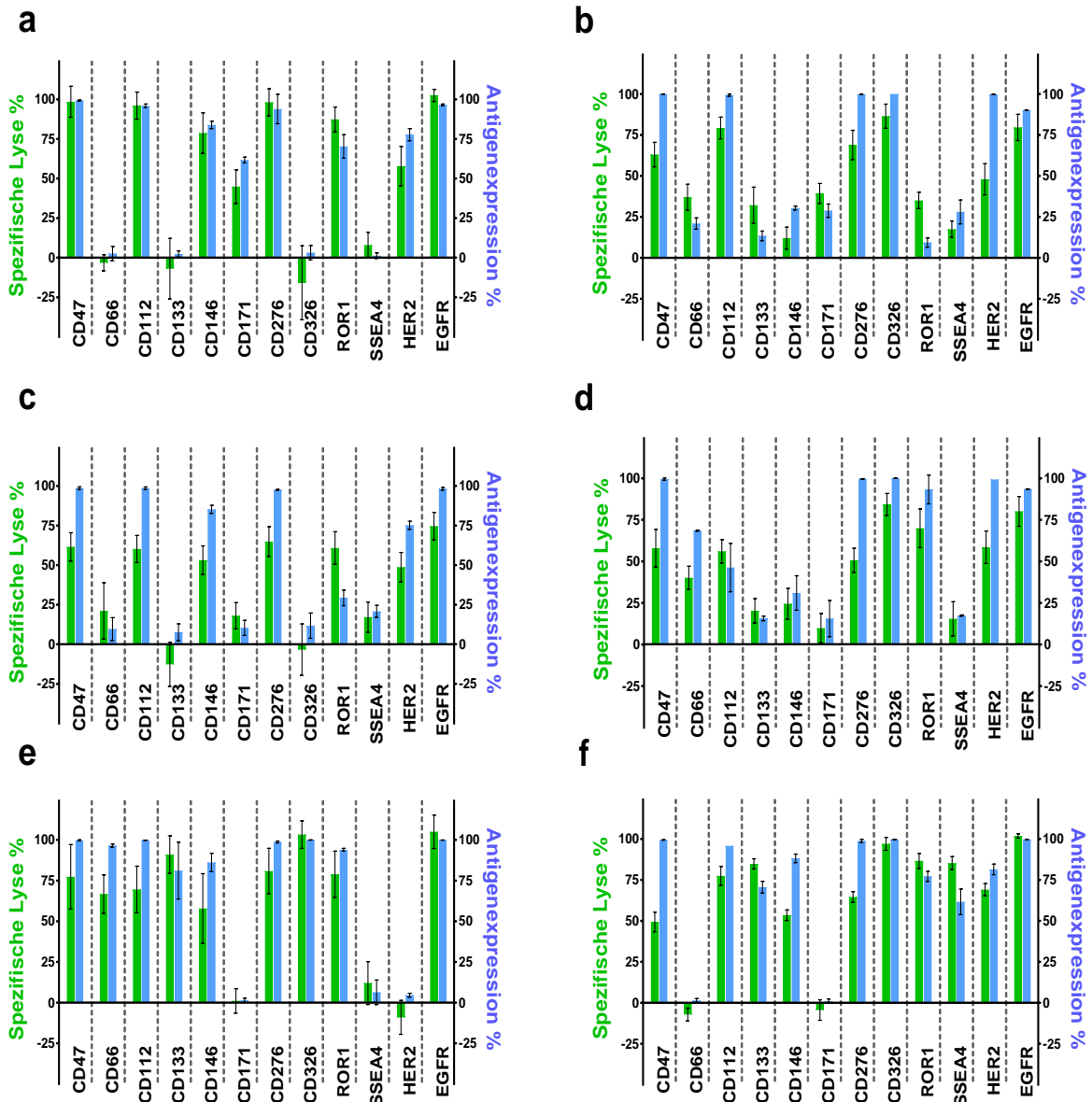


Abbildung 14: Vergleich zwischen der spezifischen Lyse und der Antigenexpression (overton)

Die Balkendiagramme zeigen den Vergleich der spezifischen Lyse mit den Werten des Antigen Screenings. a) HS578T; b) T47-D; c) BT549; d) MCF-7 e) MDA-MB-468; f) MC-1. Die grünen Balken beziehen sich auf die linke y-Achse, die Blauen auf die rechte. Die x-Achse zeigt das Antigen, das für den Zytotoxizitätsversuch oder die Färbung verwendete Adapter spezifisch band. **Grüne Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse [%]. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Die Lysewerte stammten aus Luciferase basierten Zytotoxizitätsversuchen (3 verschiedene Spender (n=3 mit je sechs technischen Replikaten) und einer E:T von 2:1. **Blaue Balken:** Mittelwerte dreier durchflusszytometrischer Messungen (Overton positiv [%]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an.

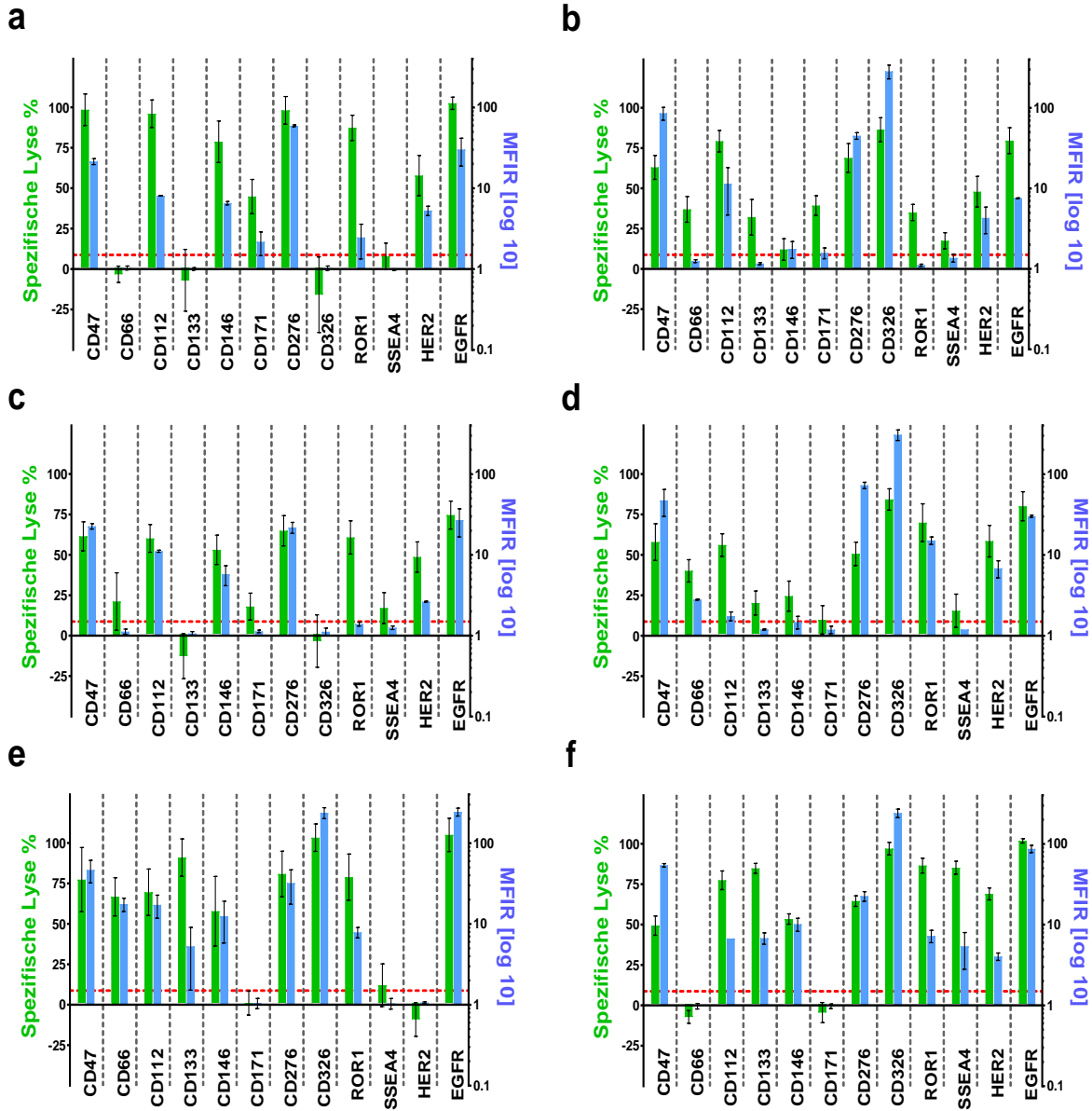


Abbildung 15: Vergleich zwischen der spezifischen Lyse und der Antigenexpression (MFI-R)

Die Balkendiagramme zeigen den Vergleich der spezifischen Lyse mit den Werten des Antigenscreenings. a) HS578T; b) T47-D; c) BT549; d) MCF-7 e) MDA-MB-468; f) MC-1. Die grünen Balken beziehen sich auf die linke y-Achse, die Blauen auf die rechte. Die x-Achse zeigt das AG, das für den Zytotoxizitätsversuch, oder die Färbung verwendete Adapter spezifisch band. **Grüne Balken:** Sie zeigen die Mittelwerte der spezifischen Lyse [%]. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Die Lysewerte stammten aus Luciferase basierten Zytotoxizitätsversuchen (3 verschiedene Spender (n=3 mit je sechs technischen Replikaten) und einer E:T von 2:1. **Blaue Balken:** Mittelwerte dreier durchflusszytometrischer Messungen (MFI-R [\log_{10}]). Die Fehlerbalken geben die SD in Prozent an.

3.7 Korrelation zwischen AG-Expression und spezifischer Lyse

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen eine Metaanalyse der AG Screening Daten und der Ergebnisse der funktionellen Testung auf deren Korrelation. Jedes AG/ Zelllinien-Paar wurde in den Abbildungen als Datenpunkt repräsentiert. Der MW der spezifischen Lyse, der sich mit einem Adapter bei einer Zelllinie erreichen ließ, wurde in y-Richtung und gegen die Werte der Adapterbindung bei dieser Zelllinie während des AG Screenings (in x-Richtung) aufgetragen. Die Werte wurden auf eine Korrelation überprüft.

Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde der Spearman Korrelationskoeffizient berechnet. Er kann einen Wert von -1 bis 1 annehmen. Kann keine Korrelation festgestellt werden, liegt er bei 0. Bei höchstmöglicher positiver Korrelation nimmt er einen Wert von 1 an, bei maximaler negativer Korrelation -1. Er macht keine Aussage darüber, in welcher Form die Werte korrelieren, sondern nur wie stark eine Zu- oder Abnahme des einen Wertes eine Zu- oder Abnahme des Anderen bedingt. Für das jeweilige Modell der Korrelation (lineare, oder exponentielle Form) wurde der R^2 Wert berechnet. Dieser nimmt einen Wert von 0 - 1 an, wobei 1 bedeutet, dass sich die Werte zu 100 % mit dem Modell beschreiben lassen. In Abbildung 16 wurden die Werte für die spezifische Lyse auf Korrelation mit den overton positive Werten untersucht. Der Spearman Korrelationskoeffizient ergab einen Wert von 0,76 bei einem p-Wert von $< 0,0001$. Außerdem wurde auf eine lineare Regression getestet. Das Modell der linearen Regression ergab einen R^2 -Wert von 0,7622 bei einem p-Wert von $< 0,0001$.

In Abbildung 17 wurde die spezifische Lyse jeweils gegen MFIR aufgetragen. Die einheitslose MFIR wurde auf einer \log_{10} Skala dargestellt. Die Werte wurden auf eine Korrelation überprüft. Der Spearman Korrelationskoeffizient ergab einen Wert von 0,81 bei einem p-Wert von $< 0,0001$. Außerdem wurde auf eine exponentielle Regression getestet. Das Modell der exponentiellen Regression ergab einen R^2 -Wert von 0,7046 bei einem p-Wert von $< 0,0001$.

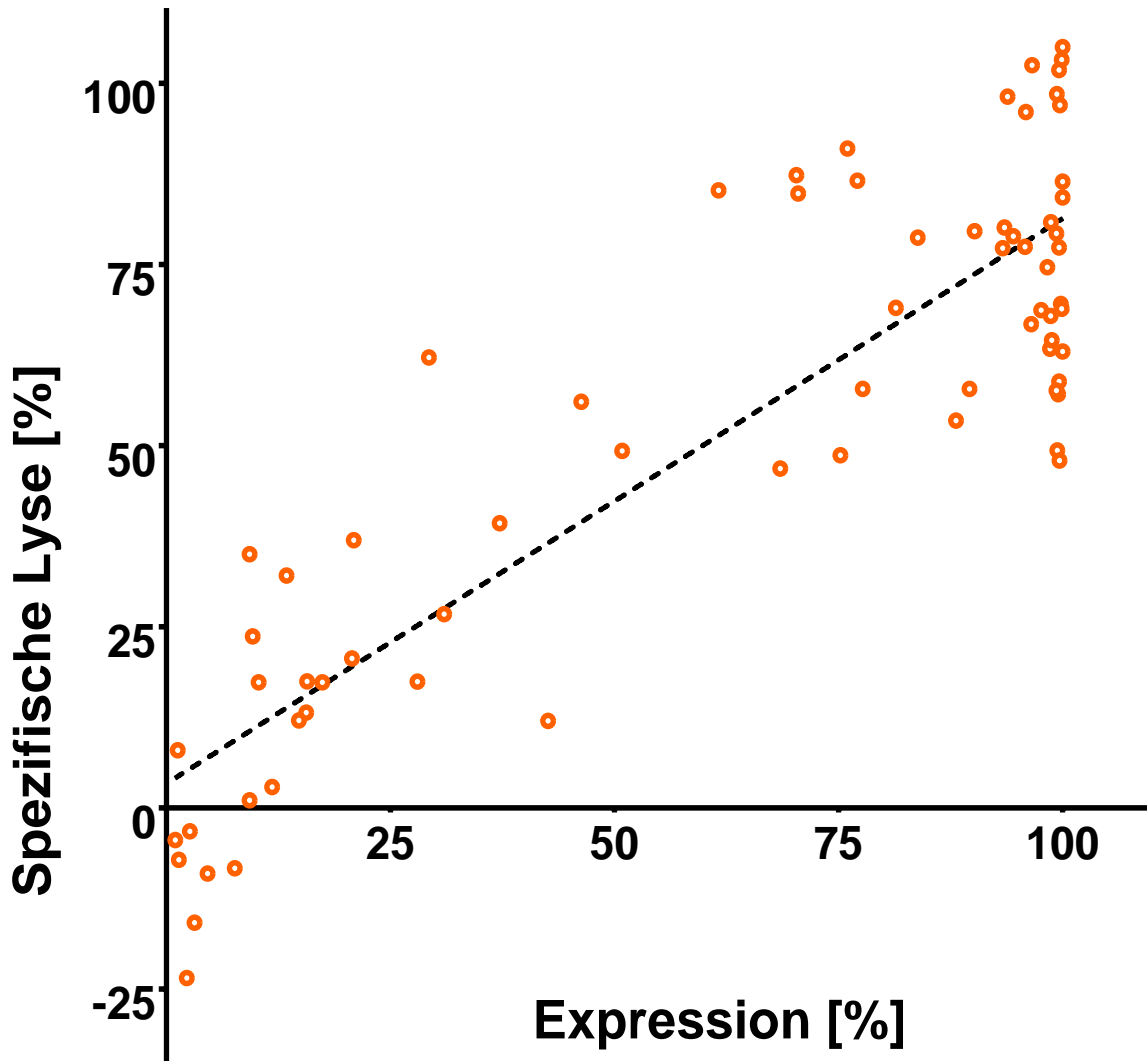


Abbildung 16: Korrelation zwischen der spezifischen Lyse und der AG-Expression

In dem Diagramm ist jedes AG/ Zelllinien-Paar als Datenpunkt repräsentiert. Der MW der spezifischen Lyse, der sich mit einem Adapter bei einer Zelllinie erreichen ließ, wurde in y-Richtung (in %) und gegen die o.p. Werte der AM Bindung bei dieser Zelllinie während des AG Screenings (in x-Richtung, in %) aufgetragen. Alle Werte sind als MW angegeben. Der Spearman Korrelationskoeffizient ergab einen Wert von 0,76. Die Daten wurden auf eine lineare Regression getestet. Die gestrichelte Linie gibt die Werte für eine 100%ige lineare Regression wieder. Die gemessenen Daten ergaben einen R^2 -Wert von 0,76.

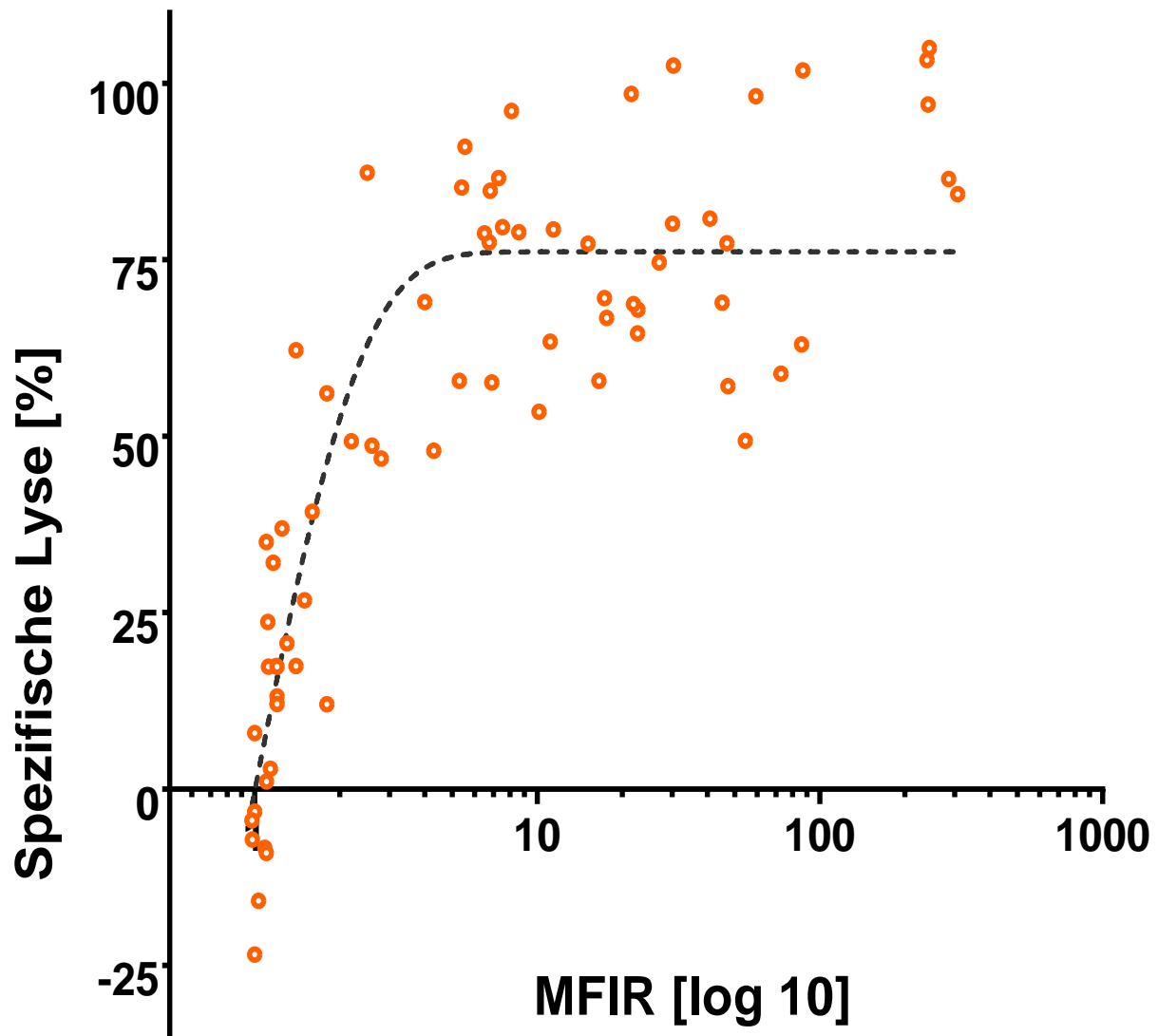


Abbildung 17: Korrelation zwischen der spezifischen Lyse und der MFIR

In dem Diagramm ist jedes AG/ Zelllinien-Paar als Datenpunkt repräsentiert. Der MW der spezifischen Lyse, der sich mit einem AM bei einer Zelllinie erreichen ließ, wurde in y-Richtung (in %) und gegen die MFIR Werte der AM Bindung bei dieser Zelllinie während des AG Screenings (in x-Richtung, \log_{10}) aufgetragen. Alle Werte sind als MW angegeben. Der Spearman Korrelationskoeffizient ergab einen Wert von 0,81. Die Daten wurden auf eine exponentielle Regression getestet. Die gestrichelte Linie gibt die Werte für eine 100% exponentielle Regression wieder. Die gemessenen Daten ergaben einen R^2 -Wert von 0,71.

4 Diskussion

4.1 Bedarf neuer Therapien

Mammakarzinom Patientinnen haben eine 5 bzw. 10 Jahres Überlebensrate von 88 % und 82 %. Aufgrund der hohen Inzidenz dieser Erkrankung, ist die Anzahl der Todesfolgen durch das Mammakarzinom dennoch sehr hoch. Nach Angaben des deutschen Zentrums für Krebsregisterdaten aus dem Jahr 2014 lag sie beispielsweise bei 17670 Frauen [1]. Fast 30 % dieser Patientinnen waren jünger als 55 Jahre [41]. Diesen vielen Patientinnen konnte mit den bisherigen Therapien nicht geholfen werden. Es besteht ein Bedarf an neuen Therapien und die aktuelle Forschung im Bereich der Immuntherapie ist folglich äußerst relevant.

4.2 Verwendeten Ziel-AG und potentielle Toxizitäten

Bei der Planung dieser Arbeit wurde eine Literaturrecherche nach potenziellen AG zur Etablierung der SPIIT durchgeführt. Gesucht wurden tumorassoziierte AG (TAA) und krebstammzelloassoziierte Antigene (CSCAA), die schon auf Mammakarzinomen nachgewiesen wurden. Es wurden 12 AG ausgewählt, um eine universelle Anwendung des AdCAR-Systems zu zeigen.

Für die AG Her2neu und EGFR gab es zum Zeitpunkt der Arbeit bereits zugelassene klinische AK. Für diese und weitere AG gab es außerdem CAR-Konstrukte, die in präklinischen Studien getestet wurden.

Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche waren nur einzelne Antigene bekannt, die vermutlich nur auf malignen Zellen vorkommen. Dies zeigt in Anbetracht der durch ErbB2-CAR-T-Zellen aufgetretenen Toxizität [30] die Relevanz eines abschaltbaren CAR Systems.

CD47 ist ein Membranprotein, das bei vielen zellulären Prozessen und Interaktionen der Zelle mit ihrer Umwelt wichtige Funktionen hat. Es spielt zum Beispiel bei der Zellmigration eine wichtige Rolle, dient als „don't eat me“ Signal

und schützt vor der Phagozytose durch Makrophagen [42]. CD47 wird auf malignen Zellen nahezu aller Tumorentitäten exprimiert [43, 44], insbesondere als Reaktion auf eine anti-tumorale Therapie [45]. Leider kommt es aber auch physiologisch auf vielen Geweben wie dem ZNS vor [46]. In Tiermodellen wurden bereits primäre anti-CD47 CAR-T-Zellen getestet [47]. CD47 ist ein gleichermaßen vielversprechendes sowie riskantes Antigen für die CAR-T-Zell Therapie, für das die Verwendung eines abschaltbaren AdCAR Systems besonders geeignet wäre.

CD66, auch bekannt unter dem Namen CEA (Carcinoembryonic antigen), ist ein Glykoprotein, von dem viele Isotypen bekannt sind. Die meisten Vertreter der CEA-Familie werden nur während der Embryonalzeit im Darm exprimiert. Im adulten Organismus wird es von Colon-, Mamma-, Lungen-, Magen- und Pankreaskarzinomzellen exprimiert [48, 49]. Eine geringe Expression im Colon kann auch physiologisch vorkommen [46].

CD112 wird auch als Nectin-2 bezeichnet und ist ein Zelladhäsionsmolekül. Als Bestandteil von adherent Junctions kommt es physiologisch auf den Epithelien fast aller Organe vor [46]. Auf Adenokarzinomen, wie Mamma- und Ovarialkarzinomen wurde eine Überexpression nachgewiesen [50]. CD112 ist ein gutes Beispiel für ein Antigen, das nicht mit einem direkten CAR angezielt werden kann, da eine dauerhafte zytotoxische Aktivität gegen Epithelzellen tödlich wäre.

CD133, auch Prominin 1, ist ein transmembranes Glykoprotein, das in adulten Stammzellen vorkommt und die Differenzierung verhindern soll. Studien zu Tumorstammzellen haben es auf therapieresistenten Tumorzellen nachgewiesen, die potent sind, neue Tumoren und Metastasen zu generieren [51]. Physiologisch wird es aber auch in den meisten Organen des Verdauungstraktes und insbesondere in den weiblichen Geschlechtsorganen exprimiert [46].

CD146 wird auch MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule) genannt, weil es regelmäßig von Melanomzellen exprimiert wird. Auf den meisten Plattenepithelkarzinomen, auf einigen Mammakarzinomen und weiteren soliden

Tumorentitäten, wurde es nachgewiesen [43, 44, 46]. Ein Hindernis für die Therapie mit direkten CAR-T-Zellen stellt die starke MCAM Expression des Gehirns und des Fettgewebes dar [46].

CD171 ist ein Membranprotein, das auch als neurales Zelladhäsionsmolekül L1 (NCAM-L1) bezeichnet wird. Es dient Zellen zur Signalweiterleitung und Interaktion mit anderen Zellen und Geweben. Nachweisbar ist es vor allem auf Zellen neuroektodermalem Ursprungs und in geringerem Ausmaß auf Lymphozyten und Endothelzellen [46]. Auf Tumoren neuronalen, neuroektodermalen und neuroendokrinen Ursprungs ist NCAM-L1 häufig überexprimiert. Auch auf weiteren Tumoren, wie Mammakarzinomen, konnte eine NCAM-L1 Expression festgestellt werden [43, 44, 46, 52]. CD171 spezifische CAR-T-Zellen die an das tumorspezifische Epitop CE7 binden, wurden bereits in präklinischen *in vivo* Studien gegen Neuroblastome eingesetzt. Trotz der physiologischen CD171 Expression auf gesundem Gewebe zeigten sich die CAR-T-Zellen als sicher und tumorspezifisch [53].

CD276 (B7-H3) ist ein Membranprotein, dessen Funktion noch nicht vollständig bekannt ist. Die Suche nach dem Rezeptor für B7-H3 war bislang nicht erfolgreich, aber es gibt zahlreiche Hinweise, dass es als co-inhibitorisches Checkpointmolekül die T-Zell Funktion moduliert [54, 55]. Auf RNA Ebene wird es in sämtlichen Geweben des Körpers exprimiert. Eine Proteinexpression konnte aber nur in Tumorzellen nahezu aller Tumorentitäten zu kommen [43, 44, 46]. Demzufolge scheint B7-H3 ein ideales Ziel für zielgerichtete Therapien zu sein. CD276 spezifische CAR-T-Zellen zeigten gegen Modelle pädiatrischer solider Tumoren und Hirntumoren bereits eine selektive und effektive Antitumoraktivität [56].

CD326 (EPCAM) ist ein calciumunabhängiges, epitheliales Zelladhäsionsmolekül. Es kommt auf der Oberfläche gesunder Epithelzellen vor und wird von Tumoren epithelialen Ursprungs wie Colon- und Mammakarzinomen überexprimiert [43, 44, 46]. Auch für dieses Antigen wurden bereits direkte CAR-T-Zellen designt. Sie wurden bisher in murinen Xenograftmodellen getestet und zeigten dort eine hohe

Effektivität [57, 58]. Aufgrund der starken physiologischen EPCAM Expression auf den Epithelien des GI-Traktes, oder auch der Nieren, ist bei der Verabreichung nicht abschaltbarer, direkter CAR-T-Zellen eine unkontrollierbare Toxizität wahrscheinlich.

ROR1 ist ein membranständiger Rezeptor, der in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Im adulten Organismus wird er kaum noch exprimiert [43, 44, 46]. Während bei mehreren Tumorentitäten eine Überexpression gezeigt werden konnte, zeigte sich nur eine geringe physiologische Expression auf Adipozyten-, Pankreas- und Oesophagusgewebe [59, 60]. Der ROR-1 blockierende, klinische AK Cirmuzumab wurde bereits in Phase 1 Studien zur Behandlung der CLL eingesetzt und zeigte dort einen hemmenden Effekt auf die Tumorzellen und erwies sich als sicher [61]. Auch für die CAR-T-Zell Therapie hat sich ROR-1 als mögliches Zielantigen erwiesen [62]. In Studien an Primaten zeigten sich keine toxischen Nebenwirkungen durch ROR-1 spezifische CAR-T-Zellen [63].

SSEA4 (Stage specific embryonic antigen 4) ist ein weiteres, mit Stammzeleigenschaften assoziiertes Antigen. Es wird während der Embryonalzeit exprimiert und kommt im adulten Organismus nur noch auf Stamm- und Keimzellen, oder Tumorzellen vor [64]. Studien zeigen, dass eine SSEA4 Expression bei soliden Tumoren positiv mit der Fähigkeit zur Chemoresistenz, Invasivität und der Bildung neuer Tumorkolonien korreliert und bezeichnen SSEA4 als Krebsstammzellmarker [65, 66]. Die starke Tumorassoziation lässt SSEA4 als ein vielversprechendes Ziel-AG für die CAR-T-Zell Therapie erscheinen. Inwieweit die Expression auf Stammzellen *in vivo* ein Problem darstellt ist bisher nicht bekannt.

EGFR (Epidermal growth factor receptor) ist ein Wachstumsrezeptor, der von allen Epithelien und Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert wird [43, 44, 46]. Eine Blockade des Rezeptors durch den klinischen AK Cetuximab ist eine etablierte, zielgerichtete Therapie für Kolonkarzinome und Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals Bereich [67]. Die Blockade nimmt den Tumorzellen den überlebenswichtigen

Wachstumsreiz. Es kann zu therapielimitierenden Nebenwirkungen z.B. an der Haut und dem GI-Trakt kommen. Eine Phase 1 Studie untersucht derzeit die Sicherheit und Effektivität EGFR806 spezifischer CAR-T-Zellen zur Behandlung pädiatrischer, EGFR positiver Hirntumore [68]. Die chimären Antigenrezeptoren dieser Studie basieren auf dem AK EGFR806, der ein tumorspezifisches Epitop des EGFR erkennt.

4.3 Das AdCAR System als Lösungsansatz

4.3.1 Der Einfluss eines AdCAR Systems auf die Sicherheit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AdCAR-T-Zellen ohne die Anwesenheit eines spezifischen Adapters keine spezifische Tumorzelllyse verursachen. Durch die Beendigung der Gabe von AM, kann die AdCAR-T-Zell Aktivierung beendet werden. Dies könnte auch *in vivo* beim Auftreten schwerer Nebenwirkungen durch ein CRS, einer Neurotoxizität, oder dem „on Target, off Tumor“ Effekt (OTOT) ein großer Vorteil gegenüber konventionellen CAR-T-Zellen sein. Es ist davon auszugehen, dass die AdCAR-T-Zellen im Patienten persistieren und die Therapie durch erneute AM Gabe jederzeit fortgesetzt werden könnte. Zusätzlich könnte das AdCAR-System die Möglichkeit bieten, die Aktivität durch die Art und Menge der verabreichten AM zu modulieren. Untersuchungen zur Pharmakokinetik infundierter AK zeigen, dass die HWZ der Plasmaelimination *in vivo* von der Konzentration und der molekularen Struktur der AK abhängt [69]. Niedrige Dosen und kleinere Moleküle werden diesen Untersuchungen zufolge schneller eliminiert. Durch ein langsames Auftitrieren der AM Dosis, oder der Verwendung von AK Fragmenten als AM könnte man die Steuerbarkeit der AdCAR-T-Zellen steigern.

Ein Fallbericht zum Einsatz HER2neu spezifischer CAR-T-Zellen berichtet von Nebenwirkungen mit Todesfolgen [30]. Ein „on Target, off Tumoreffekt“ aufgrund einer HER2neu Expression auf Lungenepithelzellen könnte zu einem Angriff des Lungenepithels durch die CAR-T-Zellen geführt haben [30]. Das Lungenversagen

könnte jedoch auch durch ein CRS bedingt gewesen sein, da eine 100-fach höhere Dosis, als die für CD19-CARS angegebene maximal tolerierbare Dosis, und zusätzlich das T-Zell-stimulierende IL2 infundiert wurden [30]. Die langanhaltende B-Zell-Aplasie bei der Therapie mit CD19-CAR-T-Zellen zeigt aber, dass es beim Anzielen sogenannter „shared antigens“, zu schweren Nebenwirkungen kommen kann. Falls sich auch *in vivo* eine Steuerbarkeit der AdCAR-T-Zell-Aktivität, durch eine Modulation der AM-Gabe zeigen lässt, hätte sowohl auf den OTOT, als auch das CRS effektiver reagiert werden können. Im Vergleich zu konventionellen CAR-T-Zellen könnte das AdCAR-System dadurch eine höhere Sicherheit bieten.

4.3.2 Der Einfluss eines AdCAR-Systems auf die Effektivität

Eine CAR-T-Zell-Therapie sollte sicher, steuerbar und effektiv sein. Eine hohe Effektivität zeigt sich durch eine Anti-Tumor-Aktivität und geringe Rezidivraten. Wichtige Faktoren eines Effektivitätsverlustes sind:

Fehlendes Engraftment: Ein mangelndes Therapieansprechen, oder frühe Rezidive korrelieren häufig mit dem fehlenden Nachweis der Effektorzellen im Blut der Patienten [70, 71]. In solchen Fällen wird von einem gescheiterten Engraftment ausgegangen, was bedeutet, dass die Effektorzellen kein Teil des patienteneigenen Immunsystems werden konnten. Schuld an einem fehlenden Engraftment kann die Überstimulation der Effektorzellen und deren Erschöpfung (Exhaustion) sein. Sie kann auch durch Mängel des CAR-T-Zell-Produktes wie einer Fehlkonstruktion des CAR auftreten. Long et al. zeigten in einer Publikation eine unspezifische Bindung zwischen den scFv-Regionen chimärer Antigenrezeptoren. Dadurch kam es zu einer Clusterbildung der CARs auf der T-Zell-Oberfläche. Aufgrund dieser AG-unabhängigen, tonischen Aktivierung kam es zu einer T-Zell-Erschöpfung. Diese zeigte sich unter anderem durch einen Proliferationsstopp, erhöhte PD-1-Expression und eine verminderte

Zytokinproduktion [72]. Eine Möglichkeit zur Deaktivierung, oder intermittierenden Aktivierung, wie es sie bei AdCAR-Zellen gibt, könnte die Effektoren vor der Exhaustion schützen und dadurch die Effektivität der Therapie steigern.

Verlust des Ziel AG: Eine weitere Ursache für einen Effektivitätsverlust der CAR-T-Zell Therapien ist der Verlust, oder die strukturelle Veränderung des Zielantigens auf der Krebszelloberfläche [73, 74]. Im Falle eines solchen „Immunescape“ könnte das Ziel-AG gewechselt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer gegen CD19-CAR resistenten B-ALL, durch Wechsel des Zielantigens zu CD22 in Remission gingen [75]. Es können auch zeitgleich mehrere Antigene angezielt werden („multiple targeting“). Sogenannte bispezifische CARs [76-78] zielen zwei AG gleichzeitig an. Das 2013 publizierte TanCAR zielt zum Beispiel CD19 und HER2 an und wird nur bei Vorhandensein beider Antigene aktiviert [77]. Die Konstruktion eines neuen CAR Konstruktes ist zeitaufwändig und teuer. Es kann zu, wie von Long et al beschriebenen, Fehlkonstruktionen kommen [72]. Jedes Konstrukt muss getestet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit dem AdCAR System ein universelles und multiples Targeting möglich ist. Das AdCAR Konstrukt bleibt unverändert. Die Herstellung biotinylierter AM ist etabliert, einfacher, schneller und kostengünstiger als die Herstellung eines neuen CAR-Konstrukts. Wobei beide erst einer Testung in Studien und einer Zulassung bedürfen. Neue AM könnten *in vitro* mit Hilfe der SPIIT Plattform evaluiert werden.

4.4 Antigen screening

4.4.1 Bedeutung des AG Screenings für die AdCAR Therapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Zelllinien der gleichen Tumorentität, eine heterogene Expression der getesteten TAA und CSCAA zeigen. Das betrifft auch Zelllinien mit ähnlicher Tumorbiologie nach Kriterien wie Ursprungsgewebe, Hormonrezeptor-, Her2neu Expression, und BRCA1 Mutationsstatus [38]. Die Zelllinien MCF-7 und T47D bzw. BT549 und HS578T sind Beispiele hierfür.

Untersuchungen auf molekularer Ebene fanden ebenfalls große Unterschiede der Proteinexpression histologisch ähnlicher Zelllinien [79]. *In vivo* zusätzlich mit einer heterogenen AG Expression innerhalb eines Tumors und zwischen Haupttumor und Metastasen rechnen [80]. Bei unterschiedlichen Tumorentitäten wurde beobachtet, dass ein Anteil der Zellen einen anderen Phänotyp besitzt, oder durch Selektionsdruck während einer Therapie den Phänotyp wechseln kann. Diese Zellen besitzen daraufhin Resistenzen gegen die Therapie und sorgen für einen Tumorprogress oder Rezidive [80, 81]. Für die Behandlung solider Tumoren sollte es demzufolge das Ziel sein, eine möglichst große Anzahl an Antigenen anzuzielen.

Die Antigenexpression ist also intra- und interindividuell sehr unterschiedlich und kann sich während der Therapie verändern. Es ist nicht davon auszugehen, dass es in Zukunft allgemeine Therapieprotokolle für die Auswahl geeigneter Ziel-AG geben wird. Im Zuge einer individualisierten Therapie ist es sehr wahrscheinlich, dass das AG Screening einen wichtigen Bestandteil zur Anpassung der AdCAR-T-Zell Therapie darstellen wird, und es auch ermöglichen könnte, den zuvor diskutierten Escape Strategien des Tumors zu begegnen.

In dieser Arbeit wurden fünf kommerzielle Brustkrebszelllinien und eine primäre Brustkrebszelllinie auf die Expression 12 verschiedener AG untersucht. Die Sekundärfärbung der Zellen und durchflusszytometrische Messung war für das AG Screening vor der *in vitro* Testung sehr gut geeignet. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Untersuchungen wie DNA und RNA Untersuchungen, weist die Methode die Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche nach. Darüber hinaus beinhaltet sie eine erste funktionelle Testung, da die Primär-AK den später verwendeten AM, und die antigenbindende Region der Sekundär-AK (scFv), jener der AdCAR-T-Zellen entspricht. Dadurch wird nicht nur die Expression des Zielantigens nachgewiesen, sondern auch die Bindung des jeweiligen AM an sein Epitop, was eine Bindung der AdCAR-T-Zelle ermöglicht.

Das Ausmaß der AG Expression wurde semiquantitativ angegeben. Um die Spezifität der AdCAR-T-Zellen zu untersuchen, war eine Quantifizierung der AG Expression nicht nötig. Um die universelle Einsetzbarkeit des AdCAR Systems zu testen und eine Korrelation zwischen der Antigendichte und der Geschwindigkeit und Effektivität AdCAR-T-Zell vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen, reichte die semiquantitative Messung der Antigenexpression ebenfalls aus. Nicht ausreichend wäre eine semiquantitative Messung zur Bestimmung eines Schwellenwertes für die Aktivierung der AdCAR-T-Zellen gewesen. Dies war jedoch nicht das Ziel dieser Arbeit. Um das Ausmaß der AG Expression anzugeben, wurde ein Algorithmus der Software FlowJo, der Overton positive, und die mediane Fluoreszenzintensitätsratio (MFIR) verwendet. Diese Auswahl erfolgte, da bei den Messungen keine Auftrennung der gemessenen Populationen in AG positive und negative Subpopulationen beobachtet wurde. Trennt sich die Population in AG positive und -negative Zellen, muss die Schwellenmethode angewendet werden. Ein Beispiel hierfür ist die Aufteilung einer T-Zell Population in CD4 positive, oder negative T-Zell Subpopulation.

Für den klinischen Einsatz ist es jedoch sicher problematisch, dass man je nach Anzahl der getesteten Antigene, viel Zellmaterial benötigt. Abhängig von der Tumorgroße, -vitalität und -lage, steht unter Umständen nur wenig Tumormaterial zur Verfügung. Um die gewünschte Anzahl an Zellen zu erhalten, müssen die Zellen *in vitro* vermehrt werden. Je länger die Kultivierung außerhalb des Körpers stattfindet, desto größer ist aber auch der potenzielle Unterschied zwischen der Antigenexpression der entnommenen und der im Patienten verbliebenen Tumorzellen. Um diesem Problem zu begegnen, müsste man entweder die Anzahl an getesteten Antigenen reduzieren, oder auf andere Färbemethoden und -protokolle zurückgreifen. Des Weiteren ist die Immunphänotypisierung nur eine Momentaufnahme der Antigenexpression, die der Expression während der funktionellen Testung nicht entsprechen muss. Die Ergebnisse des Screenings und der funktionellen Testung sind für die in dieser Arbeit getesteten Antigene

zwar konkordant, generell ist es aber denkbar, dass sowohl die *in vitro* Kultivierung, Vorbehandlung und Färbung der Zellen, als auch der Kontakt zu AdCAR-T-Zellen, die Expression mancher Antigene beeinflussen. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass diese Arbeit ein System zur *in vitro* Testung des AdCAR Systems etablieren sollte. Hierfür war die Methode sehr gut geeignet. Inwiefern die hier getesteten Antigene als Ziel-AG für die klinische AdCAR-T-Zell Therapie geeignet sind, und wie man das System für den klinischen Gebrauch anpassen kann, muss noch in weiteren Arbeiten erforscht werden.

4.4.2 Vorhersage zur Spezifität des AdCAR Systems

Um auf schwere Nebenwirkungen wie das CRS oder den OTOT Effekt zu reagieren, muss die CAR-T-Zell Aktivierung jederzeit gestoppt werden können [26, 82]. Bei der Verwendung eines AdCAR Systems ist dies durch die Beendigung der AM Gabe theoretisch möglich. Dafür muss aber sichergestellt sein, dass die Aktivierung spezifisch, also nur in Anwesenheit eines AM und dem passenden AG erfolgt. Beim Vergleich der Ergebnisse des AG Screenings und der Zytotoxizitätsversuche zeigt sich, dass sich durch das AG Screening eine spezifische AdCAR vermittelte Zytotoxizität vorhersagen lässt. Dies war bei allen 12 getesteten Antigenen der Fall.

Bei der Erstellung einer Patienten-individuellen Adapterkombination für eine AdCAR-T-Zell Therapie kann das verwendete Protokoll für das Antigenscreening als Entscheidungshilfe dienen. Auf das Anzielen eines in der SPIIT nicht nachweisbaren AG kann verzichtet werden, da keine anti-tumorale Aktivität zu erwarten ist, Nebenwirkungen wie der OTOT jedoch trotzdem auftreten können.

4.4.3 Vorhersage zur Korrelation zwischen Antigenexpression und Lyse

Das Ausmaß der spezifischen Tumorzellyse durch CAR-T-Zellen ist von vielen Faktoren abhängig und zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vollständig erforscht. Eine grundlegende Bedingung ist die Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche. Ohne Vorhandensein des Antigens kommt es zu keiner spezifischen Lyse [83]. Die Aktivierung von CAR-T-Zellen lässt sich also durch einen on/off bzw. Schwarz/Weiß-Mechanismus beschreiben. Eine Studie mit primären CD20 CAR-T-Zellen ermittelte, dass ab einem Schwellenwert von etwa 200 Ziel-AG Epitopen pro Zielzelle eine CAR-vermittelte Zytotoxizität ausgelöst werden kann. Eine weitere Zunahme der AG Dichte um den Faktor 10 stimulierte die CAR-T-Zellen zu einer Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, die die Aktivität und Proliferation der CAR-T-Zellen steigerten [84]. Auch die Ergebnisse anderer Studien zeigten diesen Zusammenhang [85-89].

Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen diesen Beobachtungen. Eine AdCAR-vermittelte Lyse fand nur bei einer messbaren Expression des Zielantigens statt. Durch die Verwendung einer niedrigen E:T Ratio und von AdCAR-T-Zellen, deren unspezifische Aktivität durch eine 48 stündige Kultivierung ohne aktivierende Zytokine reduziert wurde, konnte der Einfluss der AG Dichte beobachtet werden. Die E:T wurde so gewählt, dass am Ende des Messzeitraumes von 48h die Population, des am stärksten exprimierten Ziel-AG, komplett lysiert wurde. In den anderen Konditionen, mit geringer exprimierten Antigenen als Ziel-AG, wurde im gleichen Zeitraum eine geringere Lyse beobachtet. Am Ende der Messung ist der Trend der Tumorviabilität weiterhin abnehmend. Um wieviel sie geringer bzw. langsamer als die „maximale Lyse“ ist, ist abhängig von der AG Dichte, also den Werten des Overton positiv und der MFIR. Unter Einbeziehung der Literatur lassen sich die Ergebnisse der Arbeit wie folgt interpretieren: Für jedes Zielantigen existiert ein Schwellenwert, bei dem eine Lyse beginnt [84]. Jede Zelle der Population, deren AG Expression diesen Wert erreicht, kann von den AdCAR-T-Zellen lysiert werden. Eine Zellpopulation mit homogener Expression kann also

komplett lysiert werden. Wie schnell die Lyse durch dieses Ziel-AG stattfindet ist abhängig von der Aktivität (Anzahl der gebundenen/ aktivierten CAR) und Anzahl (Proliferationsreiz durch AG Kontakt) der AdCAR-T-Zellen, welche beide mit einer zunehmenden AG Dichte und der damit verbundenen Stimulation ansteigen [85-89].

4.4.4 Weitere, die Lyse beeinflussende Faktoren

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein vergleichbares Ergebnis wie die Untersuchung der Abhängigkeit zwischen Lyse und AG Dichte mit direkten CD20-CAR-T-Zellen [84]. Auch in dieser Studie fand bei stärkerer AG Expression eine schnellere und effektivere Tumorzelllyse statt. Wie auch in dieser Arbeit variierte die erreichte Lyse bei vergleichbarer AG Expression zwischen den verschiedenen Zelllinien. Ursächlich für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer AdCAR-vermittelten Lyse könnte zum Beispiel eine Hemmung der AdCAR-T-Zellen durch die Tumorzellen mittels PDL1 Expression, oder die Sekretion Hemmender Zytokine [90] sein. Zusätzlich gibt es Berichte über eine variable Empfindlichkeit der Tumorzelllinien gegenüber den von T-Zellen sezernierten Zytokinen [91]. Eine weitere Variable ist das CAR Konstrukt an sich. Die Spacerlänge oder die Affinität zum Ziel-AG spielen eine wichtige Rolle für die Effektivität [85-87]. In dieser Arbeit wurde für alle Versuche das gleiche AdCAR Konstrukt verwendet. Bei jeder Adapter- Antigen- Kombination ist jedoch von einer unterschiedlichen Bindungsaffinität auszugehen. Auch der Abstand zwischen der AdCAR-T-Zelle und der Tumorzelle wirkt sich auf die Effektivität aus [92] und ist bei jedem Antigen abhängig von der Zielantigenstruktur/-größe und der Epitoplage.

4.4.5 Potenzielle Bedeutung für den klinischen Einsatz

In vitro führt eine stärkere Antigenexpression zu einer stärkeren Stimulation der AdCAR-T-Zellen. Einen Schwellenwert für die Aktivierung von CAR-T-Zellen und eine mit der AG Dichte steigende Effektivität zeigten auch weitere CAR-T-Zell

Studien [85-89]. Das Ausmaß der AG Expression eines individuellen Tumors zu kennen wäre für einen klinischen Einsatz von AdCAR-T-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit relevant. Eventuell könnte man durch Auswahl eines schwach exprimierten Ziel AG die Gefahr eines CRS und einer Erschöpfung der Effektoren reduzieren. Klinisch relevant wäre es auch, anhand der Screening Daten die benötigte Adaptermenge zu bestimmen. Gerade bei geteilten Ziel-AG könnte dies relevant sein. Es ist denkbar, dass durch eine Reduktion der Adaptermenge, der für die CAR-T-Zell Aktivierung benötigte Schwellenwert auf den gesunden Zellen unterschritten wird. So könnten die Nebenwirkungen durch den „on Target/ off Tumor“ Effekt reduziert werden.

4.5 Diskussion der funktionellen Testung

4.5.1 Optimierung der Zytotoxizitätsversuche

Die Verwendung Zytokin stimulierter AdCAR-T Zellen erschwerte die Interpretation der Lysewerte. Trotz der Kultivierung in Zytokin freiem T-Zell Medium (Zytokinenzug) für 48h vor Verwendung, kam es zu einer unspezifischen Lyse/ Wachstumsretardierung der Tumorzellen. Bei jedem Versuchsansatz wurden deshalb Kontrollen zur Differenzierung zwischen unspezifischer und spezifischer Lyse angesetzt. Möglichkeiten, die unspezifischen Effekte weiter zu reduzieren, wären ein längerer Zytokinenzug und eine geringere E:T Ratio in Kombination mit einem längeren Beobachtungszeitraum. Die Beobachtung der Vitalität adhärenter Zellen mittels Luciferase kill Assay und dem xCelligence Assay konnte bei diesem Versuchsansatz jedoch nur über einen Zeitraum von 50 h erfolgen, da danach die Vitalität der Tumor- und der AdCAR-T-Zellen durch einen Nährstoffmangel unspezifisch sank. Da ein Wechsel des Zellkulturmediums durch die Entfernung der AdCAR-T-Zell Zytokine und der AM die Ergebnisse verfälscht hätte, wäre eine Reduktion der Tumorzellzahl ein Lösungsansatz.

4.5.2 Stellenwert der funktionellen Testung

Bei der Immunphänotypisierung erfolgte der Antigennachweis mittels Sekundärfärbung. Dies beweist, dass das Epitop auf der Zelloberfläche vorhanden ist und durch den Adapter gebunden werden kann. Der Sekundär-AK und der AdCAR besitzen eine analoge Bindungsdomäne. Dadurch zeigt das AG Screening gleichzeitig, dass die AdCAR-T-Zelle theoretisch über das AM an der Zielzelle binden kann. Zur Überprüfung dieser Theorie war eine funktionelle Testung nötig. Das AdCAR-System war mit den 12 getesteten Adaptern kompatibel. Alle getesteten Antigene funktionierten mit akzeptablen Abweichungen, wie die Ergebnisse des Screenings es erwarten ließen. Fünf kommerzielle und eine primäre Brustkrebszelllinie wurden bei Expression des Zielantigens spezifisch lysiert. Da die Ergebnisse des AG Screenings eine Aussage ermöglichen, ob die Expression eines AG die AdCAR-vermittelte Lyse ermöglicht, stellt sich die Frage, ob die funktionelle Testung weiterhin als Bestandteil der SPIIT Plattform benötigt wird. Schließlich benötigt man für die funktionelle Testung eine große Anzahl an Tumorzellen und AdCAR-T des Patienten. Bei der Auswahl eines in dieser Arbeit verwendeten Ziel-AG und AM ist der Informationsgewinn demgegenüber nicht sehr hoch, da bekannt ist, dass die AM vermittelte Lyse mit den Ergebnissen des AG Screenings *in vitro* korreliert. Es wäre wünschenswert, dass die *in vitro* Analyse zukünftig zu derart verlässlichen Parametern führt, dass eine Aussage über die *in vivo* vermittelte Lyse getroffen werden kann. Es zeigte sich jedoch, dass die Tumorzellen unterschiedlich empfindlich für eine AdCAR-T-Zell vermittelte Lyse waren. Auch *in vivo* könnte eine funktionelle Testung daher sinnvoll sein, um die Resistenz des Tumors und die Funktion der Effektoren zu testen.

4.5.3 Stärken der SPIIT

Die SPIIT ist jedoch vor Allem für die Weiterentwicklung der AdCAR-T-Zell Therapie, die Suche nach neuen AG und die *in vitro*-Evaluation neuer Adapter sehr gut geeignet. In diesen Bereichen ist eine funktionelle Testung relevant. Die Anzahl an neu entdeckten tumorassoziierten AG steigt stetig an. Neue AM können in diesem nun etablierten System schnell und einfach getestet werden. Falls neue Epitope eines Antigens entdeckt werden, kann deren Effektivität mit Hilfe der SPIIT verglichen werden. Gerade bei neuen AG und Epitopen ist die funktionelle Testung wichtig. Aufgrund der 3D Struktur eines AG kann eine Bindung des sekundär-AK bei Screening zwar möglich, der Bindung der deutlich größeren Ad-CAR-T-Zelle jedoch blockiert sein. Die Arbeit zeigt, dass die SPIIT für Zelllinien und Patientenmaterial gleichermaßen geeignet ist. Auch für andere Entitäten und die Testung neuer Adaptermoleküle könnte die SPIIT eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Krebserkrankungen stellen in Deutschland, nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar. Das bedeutet, dass für eine große Anzahl an Patienten weitere therapeutische Optionen fehlen. Das Mammakarzinom stellt einen relevanten Vertreter für solide Tumoren dar und dient in dieser Arbeit als Modell. Eine CAR-T-Zell Therapie ist in Deutschland bisher nur für B-Zell Malignome eine zugelassene Behandlungsoption. Der Grund hierfür ist 1. der Mangel an bekannten, exklusiven Ziel-AG, sodass es zu einem „on Target, off Tumor Effekt“ kommen kann. Dieser kann tödlich sein, wenn die Ziel-AG auf lebensnotwendigen Geweben exprimiert werden und die CAR-T-Zell Funktion nicht steuerbar ist. Letzteres kann 2. zu einer Erschöpfung der CAR-T Zellen durch die tonische Aktivierung führen. Wird nur ein AG angezielt droht 3. der Verlust der AG-Expression auf den Tumorzellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten AdCAR-T-Zellen wurde die AG Erkennung und die T-Zell Aktivierung durch ein Adaptersystem auf zwei Untereinheiten aufgeteilt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass nur durch Zugabe eines passenden AM eine AdCAR-T-Zell Aktivierung erfolgt und das Anzielen verschiedener AG möglich ist. Dies ist ein Lösungsansatz bei Auftreten eines 1. „on Tumor, off Target Effekt“ und anderer Nebenwirkungen, 2. bei einer Erschöpfung der Effektoren durch eine tonische Aktivierung. Durch den Wechsel des AM kann auf (3.) einen Ziel-AG Verlust reagiert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Screeningplattform für individualisiertes Immunotargeting (SPIIT) etabliert. Die semiquantitative, durchflusszytometrische Immunphänotypisierung eignete sich für das AG Screening der fünf kommerziellen und einer patientengenerierten Brustkrebszelllinie auf 12 AG. Anschließend konnte *in vitro* eine spezifische und steuerbare Lyse der Tumorzellen, durch eine Kombination von AdCAR-T-Zellen und passenden AM, für alle AG gezeigt werden. Bei fehlender AG Expression oder Abwesenheit eines passenden AM, konnte keine AdCAR vermittelte Tumorzellyse beobachtet werden. Die Effektivität der Tumorzellyse durch die AdCAR-Zellen korrelierte mit dem Ausmaß der gemessenen AG Expression.

6 Anhang

6.1 Protokolle

6.1.1 Virusherstellung

Transfektion: Die HEK293T Zellen wurden im Stickstofftank der Kinderklinik Tübingen kryokonserviert und einen Tag vor Beginn der Transfektion aufgetaut. Je $1,5 \times 10^7$ Zellen wurden in 20 ml SLA ohne P/S, in eine T175 Zellkulturflasche ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 70 -90 % konfluent gewachsen waren. Die Kultivierung fand in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ statt. Die Transfektion wurde durch Lipofectamin erleichtert, das lipiddoppelschichtige Vesikel um die zu transportierenden Plasmide bildet. Durch die Verschmelzung der Lipofectaminvesikel mit der Zellmembran, gelangten die Plasmide in das Cytoplasma der HEK293T Zellen. Es wurde nach dem angepassten Herstellerprotokoll verfahren (Angaben für eine T175 Zellkulturflasche):

Lösung A: 4 ml Opti MEM + 9,4 µg Plasmid A + 39,2 µg Plasmid B + 31,4 µg Plasmid C

Lösung B1: 2 ml Opti MEM + 65 µl Lipofectamine - gut Vortexen

Lösung B2: 2 ml Opti MEM + 130 µl Lipofectamine - gut Vortexen

- Eine Hälfte von Lösung A mit Lösung B1 und die restliche Lösung A mit Lösung B2 mischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Entfernen des Zellkulturmediums aus der Zellkulturflasche der HEK293T.
- Vorsichtig 19 ml DMEM und die gemischten Lösungen A/B1 und A/B2 in die Zellkulturflasche der HEK293T Zellen geben.
- Aufbewahrung der transfizierten Zellen im Brutschrank.
- Hinzufügen von 3 ml FCS h.i. nach 6 h.

- Nach 24 h, 48 h und 72 h: Ernte der Viren durch abnehmen des Zellkulturmediums und Ersatz durch 20 ml VLE DMEM (10 % FCS h.i. und 1 mM HEPES)

Virusernte: Die Virusernte fand 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion statt. Das gesamte Zellkulturmedium wurde aus der Zellkulturflasche entfernt und durch 20 ml VLE DMEM (10 % FCS h.i. und 1 mM HEPES) ersetzt. Alle weiteren Schritte fanden gekühlt statt. In 50 ml Falcons wurden die Überstände bei 4 °C, 500 g, 10 min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand enthielt die viralen Vektoren. Durch ein 0,45 µm Filter wurde er in ein frisches Falcon überführt. Der Überstand wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit dem LentiX-Concentrator Reagent gemischt und über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand bei Programm 8 zentrifugiert, um die Verbindung aus Viren und Reagent zu pelletieren. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Viruspellet in kaltem PBS resuspendiert werden. Durch die Aufnahme in einem Hundertstel des vorherigen Volumens, wurde der Virustiter 100-Fach aufkonzentriert. Die Virensuspension wurde in 100 µl pro Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

6.1.2 Kultivierung der Tumorzelllinien

Das alte Zellkulturmedium wurde komplett entfernt. Um Serumreste zu entfernen wurde der Zellrasen mit 100 µl gepufferter Kochsalzlösung (PBS) pro cm² gespült. Der Zellrasen wurde dann mit 30 µl Trypsin/EDTA pro cm² benetzt und vier Minuten, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Verdauungsreaktion mit 90 µl Zellkulturmedium pro cm² gestoppt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren ließen sich die Zellen suspendieren. Um das Trypsin/EDTA weitestgehend zu entfernen zentrifugierte man die Zellen bei Programm 9, verwarf den Trypsin-haltigen Überstand und ersetzte ihn durch 4 ml frisches Zellkulturmedium (ZKM). Nach der Zellzahlbestimmung wurde die

gewünschte Zellzahl (Tabelle 12, Spalte 3) in eine frische Zellkulturflasche mit 130 µl ZKM pro cm² (Tabelle 12, Spalte 2) überführt.

Zellzahlbestimmung: Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops und einer Neubauer Zählkammer, einer Vertiefung in einer objektträgerähnlichen Glasplatte, die nach oben hin durch ein Deckglas abgeschlossen wird. Dadurch entsteht ein Raum definierten Volumens. In den Boden der Zählkammer sind Linien eingraviert, die ihn in große und kleine Quadranten einteilen. Füllt man eine vorverdünnte (Formel 2, Verdünnungsfaktor) und mit Trypanblau gefärbte Zellsuspension in die Kammer, projizieren sich vitale Zellen als helle Punkte vor dem blauen Hintergrund auf die Quadranten. Apoptotische, oder nekrotische Zellen können den Farbstoff nicht ausschließen weshalb sie sich blau anfärben. Nekrotische Zellen werden somit nicht mitgezählt. Die Summe der lebendigen Zellen lässt sich mit Formel 2 berechnen.

Formel 2: Berechnung der Zellzahl

$$\frac{\text{Summe}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor} * 2 * 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

6.1.3 Antigen screening der Brustkrebszelllinien, Sekundärfärbung

- Die Zellen nach Zellpflegeprotokoll in Suspension bringen und zählen.
- Je 250000 Zellen in ein FACS Tube überführen und mit 2 ml kaltem MACS Puffer (M.P.) verdünnen.
- Zentrifugieren (Prog. 4) und den Überstand komplett entfernen.
- In 50 µl kaltem M.P. resuspendieren und 1 µl hum. IgG (10 %) als FcR-Block hinzufügen

- Primär AK hinzufügen (5 μ l bei 11 ng/ μ l, klinische AK vorverdünnen) und vortexen.
- 15 min bei 4 °C inkubieren.
- mit 2 ml M.P (4°C) verdünnen, zentrifugieren (Prog.4), Überstand komplett entfernen
- in 50 μ l kaltem M.P. aufnehmen, 2.5 μ l anti-biotin-AK (FITC) hinzufügen, vortexen.
- 15min bei 4°C inkubieren.
- mit 2 ml M.P (4°C) verdünnen, zentrifugieren (Prog.4).
- Überstand abkippen, vortexen und zeitnah messen.

6.2 AdCAR-T-Zell Expansion

Tag 0: T-Zell Gewinnung und Stimulation

0.1 Blutentnahme:

- Entnahme mit 50 ml Spritzen mit 0,1 ml Natrium-Heparin/10 ml Vollblut

0.2 Dichtegradientenzentrifugation/ Ficoll:

- Blut 1:1 mit sterilem PBS (RT) mischen
- Je ein 50 ml Falcon mit 20 ml sterile Biocoll-Ficoll Lösung befüllen
- In jedes Falcon 30 ml Blut/ PBS vorsichtig auf die Biocoll Lösung pipettieren.

Die Phasen dürfen sich nicht vermischen.

- Zentrifugieren (Prog. 1)
- Die PBMC (Ring über der Biocoll Phase) vorsichtig abpipettieren.
- Die PBMC in ein frisches, steriles 50 ml Falcon füllen und mit PBS (RT) auffüllen.
- Zentrifugieren (Prog. 2)
- Den Überstand entfernen, resuspendieren (PBS) und das Falcon wieder auffüllen (PBS).
- Zentrifugieren (Prog. 3)
- Die Zellen resuspendieren und in 10 ml RPMI aufnehmen
- Die Zellen zählen (Neubauer, oder ADVIA)

0.3 MACS CD4 / CD8:

Je nach benötigter T-Zellzahl (ca. 50 % der PBMC T-Zellen, CD4/CD8 ca. 2:1) mit der gewünschten Menge Zellsuspension fortfahren. Falls nicht anders beschrieben werden die Zellen mit Programm 5 zentrifugiert.

- Zellen zentrifugieren und den Überstand entfernen.
- In kaltem M.P. gut resuspendieren (100 μ l per 10^7 Zellen)
- 20 μ l anti-CD8 MB pro 10^7 Zellen hinzufügen. Gut mischen und 15 min bei 4°C inkubieren
- Mit 1-2 ml M.P. waschen
- Zentrifugieren und den Überstand entfernen
- Eine LS Säule im MACS Magnet fixieren und mit 3 ml M.P. spülen
- Zellsuspension in die Säule pipettieren
- Unmarkierte Zellen (darunter CD4+) unter der Säule mit einem Falcon auffangen
- Danach drei Mal 3 ml M.P. durch die Säule laufen lassen
- Die Säule aus dem Magnet entfernen und 5 ml M.P. in die Säule geben
- Die markierten Zellen mit dem Stempel in ein frisches Falcon spülen
- Die CD8 T-Zellen zählen und 3x mit 50 ml RPMI waschen, um EDTA Reste zu entfernen
- Mit den unmarkierten Zellen alle Schritte wiederholen, aber anti-CD4 MB verwenden

0.4 Stimulation:

Die Zellen in eine 24 Kv Platte überführen . Je Kv 1 Mio CD4+ Zellen und 1 Mio CD8+ Zellen in insgesamt 2 ml SLE aufnehmen. In jede Kv 20 μ l TransAct hinzugeben.

Tag 1: Transduktion

- Die Zentrifuge auf 32 °C vorheizen und eine Tara Platte vorbereiten.
- 1 ml Medium pro Kv entfernen, ohne die Zellen zu aspirieren.
- 50 µl Virusüberstand in jede zu transduzierende Kv pipettieren.
- Mit Programm 7 zentrifugieren.
- Die Zellen in den Inkubator stellen.

Tag 3: TransACT Verdünnung

In jeder Kv 0,5 ml Medium entnehmen (S2 Müll) ohne die Zellen zu aspirieren (Rest 0,5 ml). Die Kv komplett mit warmer SLD auffüllen.

Tag 4: Medium verdreifachen

Tag 7: AdCAR-T-Zell Anreicherung und Quantifizierung

7.1 LNGFR MACS:

Verfahren wie an Tag 0, Abschnitt 3. Es werden anti-LNGFR Microbeads verwendet. Die unmarkierten Zellen können verworfen werden. Die positiv selektionierten Zellen nach dem Waschen in 1 ml warmer SLD pro 1 Mio Zellen aufnehmen.

7.2 Durchflusszytometrischer LNGRF-Nachweis

Der AdCAR Nachweis erfolgt indirekt über den Nachweis einer LNGFR Expression (Äquimolare Koexpression beider Proteine).

Folgende Ansätze werden benötigt:

- Unstained (MOCK-T-Zellen ungefärbt)

- MOCK (MOCK-T-Zellen mit Mastermix gefärbt)
 - AdCAR-T-Zellen (Transduzierte Zellen mit Mastermix gefärbt)
- Je 0,25 Mio Mock T-Zellen, bzw. CAR-T-Zellen in ein FACS Tube füllen.
- Mit je 2 ml kaltem M.P. verdünnen und bei Programm 4 zentrifugieren.

Mastermix: Folgende AK mischen und vortexen, Mengenangabe je Tube.

- 3 µl anti-CD4 BUV395
 - 5 µl anti-CD8 APCvio770
 - 5 µl anti-LNGFR FITC
- In 50 µl M.P. resuspendieren und mit 13 µl Mastermix/Tube 15min bei 4°C inkubieren.
- Mit je 2ml kaltem M.P. waschen und bei Programm 4 zentrifugieren.
- Messung (s.Methodenteil)

Ab Tag 9: Expansion

Zellen sollten immer auf 1Mio/ml eingestellt sein. Je nach Wachstumsphase der Population kann alle 2 Tage das Medium verdoppelt, oder zu 50 % ausgetauscht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Berlin, Z.f.K.i.R.K.-I.H., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016.
2. Holleczeck, B., L. Jansen, and H. Brenner, *Breast cancer survival in Germany: a population-based high resolution study from Saarland*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70680.
3. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
4. Grimm, M., et al., *ABCB5 expression and cancer stem cell hypothesis in oral squamous cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2012. **48**(17): p. 3186-97.
5. Maruta, H., *From chemotherapy to signal therapy (1909-2009): A century pioneered by Paul Ehrlich*. Drug Discov Ther, 2009. **3**(2): p. 37-40.
6. Muul, L.M., et al., *Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma*. J Immunol, 1987. **138**(3): p. 989-95.
7. Delorme, E.J. and P. Alexander, *Treatment of Primary Fibrosarcoma in the Rat with Immune Lymphocytes*. Lancet, 1964. **2**(7351): p. 117-20.
8. Eberlein, T.J., M. Rosenstein, and S.A. Rosenberg, *Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2*. J Exp Med, 1982. **156**(2): p. 385-97.
9. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
10. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*. N Engl J Med, 1988. **319**(25): p. 1676-80.
11. Kessels, H.W., et al., *Immunotherapy through TCR gene transfer*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 957-61.
12. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
13. Seliger, B., et al., *HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(1): p. 3-13.
14. Chmielewski, M. and H. Abken, *CAR T cells transform to trucks: chimeric antigen receptor-redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(8): p. 1269-77.
15. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10024-8.

16. Irving, B.A. and A. Weiss, *The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways*. Cell, 1991. **64**(5): p. 891-901.
17. Park, J.H. and R.J. Brentjens, *Are all chimeric antigen receptors created equal?* J Clin Oncol, 2015. **33**(6): p. 651-3.
18. Maher, J., et al., *Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 70-5.
19. Milone, M.C., et al., *Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo*. Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1453-64.
20. Brentjens, R.J., et al., *CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia*. Sci Transl Med, 2013. **5**(177): p. 177ra38.
21. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
22. Lee, D.W., et al., *T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet, 2015. **385**(9967): p. 517-528.
23. Maude, S.L., et al., *Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia*. N Engl J Med, 2014. **371**(16): p. 1507-17.
24. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
25. Turtle, C.J., et al., *Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells*. Sci Transl Med, 2016. **8**(355): p. 355ra116.
26. Lee, D.W., et al., *Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome*. Blood, 2014. **124**(2): p. 188-95.
27. Santomaso, B.D., et al., *Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cancer Discov, 2018. **8**(8): p. 958-971.
28. Hu, Y., et al., *Predominant cerebral cytokine release syndrome in CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cell therapy*. J Hematol Oncol, 2016. **9**(1): p. 70.
29. Davila, M.L., et al., *CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61338.
30. Morgan, R.A., et al., *Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2*. Mol Ther, 2010. **18**(4): p. 843-51.
31. Holzinger, A., M. Barden, and H. Abken, *The growing world of CAR T cell trials: a systematic review*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(12): p. 1433-1450.

32. Zhao, Y., et al., *Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor*. *Cancer Res*, 2010. **70**(22): p. 9053-61.
33. Gargett, T. and M.P. Brown, *The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells*. *Front Pharmacol*, 2014. **5**: p. 235.
34. Wang, X., et al., *A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. 1255-63.
35. Sakemura, R., et al., *A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration*. *Cancer Immunol Res*, 2016. **4**(8): p. 658-68.
36. Wu, C.Y., et al., *Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor*. *Science*, 2015. **350**(6258): p. aab4077.
37. Terziyska, N., et al., *In vivo imaging enables high resolution preclinical trials on patients' leukemia cells growing in mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e52798.
38. Dai, X., et al., *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping*. *J Cancer*, 2017. **8**(16): p. 3131-3141.
39. Boyum, A., *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages*. *Scand J Immunol*, 1976. **Suppl 5**: p. 9-15.
40. Karimi, M.A., et al., *Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e89357.
41. Krebsregisterdaten, *Z.f. Krebsregisterdaten: Mammakarzinom*. 2014; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html.
42. Willingham, S.B., et al., *The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(17): p. 6662-7.
43. Uhlen, M., et al., *A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(12): p. 1920-32.
44. Uhlen, M., et al., *A pathology atlas of the human cancer transcriptome*. *Science*, 2017. **357**(6352).
45. Samanta, D., et al., *Chemotherapy induces enrichment of CD47(+)/CD73(+)/PDL1(+) immune evasive triple-negative breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(6): p. E1239-E1248.
46. Uhlen, M., et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. *Science*, 2015. **347**(6220): p. 1260419.
47. Golubovskaya, V., et al., *CD47-CAR-T Cells Effectively Kill Target Cancer Cells and Block Pancreatic Tumor Growth*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(10).
48. Beauchemin, N. and A. Arabzadeh, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(3-4): p. 643-71.

49. Estiar, M.A., et al., *High expression of CEACAM19, a new member of carcinoembryonic antigen gene family, in patients with breast cancer*. Clin Exp Med, 2017. **17**(4): p. 547-553.
50. Oshima, T., et al., *Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 60.
51. Liou, G.Y., *CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2019. **106**: p. 1-7.
52. Inaguma, S., et al., *Expression of neural cell adhesion molecule L1 (CD171) in neuroectodermal and other tumors: An immunohistochemical study of 5155 tumors and critical evaluation of CD171 prognostic value in gastrointestinal stromal tumors*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 55276-55289.
53. Kunkle, A., et al., *Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(2): p. 466-477.
54. Chen, Y.W., C. Tekle, and O. Fodstad, *The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(5): p. 404-13.
55. Lee, Y.H., et al., *Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function*. Cell Res, 2017. **27**(8): p. 1034-1045.
56. Majzner, R.G., et al., *CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(8): p. 2560-2574.
57. Zhang, B.L., et al., *Preclinical Evaluation of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Specific to Epithelial Cell Adhesion Molecule for Treating Colorectal Cancer*. Hum Gene Ther, 2019. **30**(4): p. 402-412.
58. Ang, W.X., et al., *Intraperitoneal immunotherapy with T cells stably and transiently expressing anti-EpCAM CAR in xenograft models of peritoneal carcinomatosis*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 13545-13559.
59. Balakrishnan, A., et al., *Analysis of ROR1 Protein Expression in Human Cancer and Normal Tissues*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(12): p. 3061-3071.
60. Hojjat-Farsangi, M., et al., *The receptor tyrosine kinase ROR1--an oncofetal antigen for targeted cancer therapy*. Semin Cancer Biol, 2014. **29**: p. 21-31.
61. Choi, M.Y., et al., *Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(6): p. 951-959 e3.
62. Hudecek, M., et al., *The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4532-41.
63. Berger, C., et al., *Safety of targeting ROR1 in primates with chimeric antigen receptor-modified T cells*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(2): p. 206-16.
64. Lou, Y.W., et al., *Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): p. 2482-7.

65. Aloia, A., et al., *The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features*. *Breast Cancer Res*, 2015. **17**(1): p. 146.
66. Sivasubramaniyan, K., et al., *Expression of stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) defines spontaneous loss of epithelial phenotype in human solid tumor cells*. *Glycobiology*, 2015. **25**(8): p. 902-17.
67. Concu, R. and M. Cordeiro, *Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer*. *Curr Top Med Chem*, 2018. **18**(3): p. 192-198.
68. Juliane Gust, M., PhD, Seattle Children's Hospital. *EGFR806-specific CAR T Cell Locoregional Immunotherapy for EGFR-positive Recurrent or Refractory Pediatric CNS Tumors*. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03638167>.
69. Li, Z. and D.K. Shah, *Two-pore physiologically based pharmacokinetic model with de novo derived parameters for predicting plasma PK of different size protein therapeutics*. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2019. **46**(3): p. 305-318.
70. Chung, D.J., et al., *T-cell Exhaustion in Multiple Myeloma Relapse after Autotransplant: Optimal Timing of Immunotherapy*. *Cancer Immunol Res*, 2016. **4**(1): p. 61-71.
71. Kershaw, M.H., et al., *A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6106-15.
72. Long, A.H., et al., *4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors*. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 581-90.
73. Jacoby, E., et al., *CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12320.
74. Sotillo, E., et al., *Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(12): p. 1282-95.
75. Fry, T.J., et al., *CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy*. *Nat Med*, 2018. **24**(1): p. 20-28.
76. Fedorov, V.D., M. Themeli, and M. Sadelain, *PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(215): p. 215ra172.
77. Grada, Z., et al., *TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e105.
78. Lanitis, E., et al., *Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo*. *Cancer Immunol Res*, 2013. **1**(1): p. 43-53.
79. Aka, J.A. and S.X. Lin, *Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31532.

80. Seip, K., et al., *Stroma-induced phenotypic plasticity offers phenotype-specific targeting to improve melanoma treatment*. Cancer Lett, 2018. **439**: p. 1-13.
81. Fukuda, K., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status*. Cancer Res, 2019.
82. Davila, M.L., et al., *Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia*. Sci Transl Med, 2014. **6**(224): p. 224ra25.
83. O'Rourke, D.M., et al., *A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma*. Sci Transl Med, 2017. **9**(399).
84. Watanabe, K., et al., *Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells*. J Immunol, 2015. **194**(3): p. 911-20.
85. Arcangeli, S., et al., *Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia*. Mol Ther, 2017. **25**(8): p. 1933-1945.
86. Caruso, H.G., et al., *Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity*. Cancer Res, 2015. **75**(17): p. 3505-18.
87. Hudecek, M., et al., *Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(12): p. 3153-64.
88. Walker, A.J., et al., *Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase*. Mol Ther, 2017. **25**(9): p. 2189-2201.
89. Weijtens, M.E., E.H. Hart, and R.L. Bolhuis, *Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytotoxicity and lymphokine production*. Gene Ther, 2000. **7**(1): p. 35-42.
90. Yeku, O.O., et al., *Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10541.
91. Braumuller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. **494**(7437): p. 361-5.
92. Hombach, A.A., et al., *T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4650-7.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätskliniken Tübingen unter Betreuung von Professor Peter Lang durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Seitz (Betreuer) und Dr. Patrick Schlegel (Betreuer).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. Patrick Schlegel, Dr. Christian Seitz, Florian Heubach, Stephanie Zug, Jana Hau, Maximilian Wiedenmann und Alexander Jöchner von mir eigenständig durchgeführt. Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung der Tumorzelllinien wurde durch Stephanie Zug durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Patrick Schlegel durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.01.2020

9 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

Meinen Doktorvater und meine Betreuer für die Förderung, Betreuung und die viele Zeit, die sie in mich und das Projekt investierten.

An alle Mitglieder und Kooperationspartner der AG Lang und der IRTG des SFB685 für Ihre Unterstützung, insbesondere:

Giulia, Florian, Armin und Stephanie.

Und natürlich an meine Familie und meine großartigen Freunde. Danke für den Rückhalt, die bedingungslose Unterstützung, Eure Zeit und die vielen lieben Worte