

Aus der  
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

**CAR NK Zelltherapie im Glioblastom: Effekte  
ionisierender Strahlung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Prause, Lukas

Promotionsjahr  
2025

Dekan: Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Nat. Cora Weigert

Tag der Disputation: 18.12.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
4.1	Glioblastom	9
4.2	Subgruppen des Glioblastoms	9
4.3	Immunregulation	10
4.4	Immunsuppressive Natur des Glioblastom	12
4.5	Immunogene Effekte ionisierender Bestrahlung	13
4.6	Rolle von CD276	14
4.7	Chimäre Antigen Rezeptoren	19
4.8	Natürliche Killerzellen	20
4.9	NK-92 Zellen	21
4.10	CD276-CAR NK-92 Zellen	22
4.11	Interaktion ionisierender Bestrahlung mit CD276-CAR NK Zelltherapie	22
4.12	Ziel der Arbeit	23
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
5.1	Herkunft der Zellen	24
5.2	Zellkultur	25
5.3	Bestrahlung	25
5.4	RNA-Isolierung und real-time RT-PCR	25
5.5	Durchflusszytometrie	26
5.6	Zytotoxizitätstest	26
5.7	Knockdown-Experimente	27
5.8	Fluoreszenzmikroskopie	27
5.9	Statistische Auswertung	28
5.10	Materialien	28
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
6.1	Charakterisierung der patientenstämmigen Stammzell-anreichernde. Glioblastomkulturen	31
6.2	CAR NK-92 Zellaktivität	35
6.3	Bestrahlungseffekte auf Genexpression	38
6.4	Bestrahlungseffekte im FACS	40
6.4.1	Bestrahlungskinetik	40
6.4.2	Bestrahlungsdosis	42

6.5	Bestrahlungseffekte im Zytotoxizitäts-Assay _____	44
6.6	CD276 Knockdown _____	47
<b>7.</b>	<b><i>Diskussion</i></b> _____	<b>51</b>
7.1	CD276 im Glioblastom _____	51
7.2	CD276 Regulationsmechanismen im Glioblastom _____	52
7.3	Vielversprechende Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen _____	52
7.4	Bestrahlungseffekte auf CD276 mRNA-Abundanz und Oberflächenexpression _____	54
7.5	Bestrahlungsbedingte Modulierung der CD276-CAR NK-92 Zellen Aktivität _____	55
7.6	Antigenabhängigkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen _____	55
7.7	Ungeklärte Herausforderungen der CD276-CAR NK Therapie _____	57
7.8	Limitation _____	58
7.9	Fazit _____	58
<b>8.</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> _____	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> _____	<b>62</b>
<b>10.</b>	<b><i>Erklärung und Eigenanteil</i></b> _____	<b>75</b>
<b>11.</b>	<b><i>Veröffentlichung</i></b> _____	<b>75</b>
<b>12.</b>	<b><i>Danksagung</i></b> _____	<b>76</b>

## 1. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> CD276-assoziiertes Gesamtüberleben von Glioblastom- und niedriggradigen Gliom-Patienten _____	16
<b>Abbildung 2:</b> Subtypen des Glioblastoms _____	32
<b>Abbildung 3:</b> CD276 Expressionsprofil der pGSZ-Kulturen _____	34
<b>Abbildung 4:</b> CAR NK Lyseaktivität _____	37
<b>Abbildung 5:</b> PCR Kinetik _____	39
<b>Abbildung 6:</b> Bestrahlungskinetik Oberflächenexpression _____	41
<b>Abbildung 7:</b> Bestrahlungsdosis Oberflächenexpression _____	43
<b>Abbildung 8:</b> Bestrahlungseffekt CAR NK-Aktivität (2,5:1 E:Z-Ratio) _____	45
<b>Abbildung 9:</b> Bestrahlungseffekte CAR NK-Aktivität (0,5:1 E:Z-Ratio) _____	46
<b>Abbildung 10:</b> Histogramm - siRNA vermittelter CD276 Knockdown _____	48
<b>Abbildung 11:</b> siRNA vermittelter Knockdown von CD276 _____	50

## 2. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.:</b> <i>Klinische Studien von gegen B7-H3 (CD276)-gerichteter Therapien</i> _____	17
<b>Tabelle 2:</b> <i>Chemikalien</i> _____	28
<b>Tabelle 3:</b> <i>Labormaterialien</i> _____	29
<b>Tabelle 4:</b> <i>Geräte und Software</i> _____	30

### 3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster Of Differentiation
CRS	Cytokin release syndrome Zytokin Freisetzung Syndrom
Da	Dalton
DAMPs	Damage-associated molecular patterns gefahrenassoziierte molekulare Muster
E:Z-Ratio	Effektor-Zielzell-Verhältnis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCS	Fetal calf serum Fetales Kälberserum
FDA	US Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
G	Fallbeschleunigung
Gy	Gray
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HLA	Humane Leukozytenantigene
IDH	Isozitatdehydrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin

ILT	Human inhibitory receptors Ig-like transcript Humaner hemmender Rezeptor Immunoglobulin-ähnliches Transkript
IKCa	Ca <sup>2+</sup> -activated intermediate conductance channels Ca <sup>2+</sup> -aktivierte K <sup>+</sup> -Kanäle mit intermediärer Leitfähigkeit
k	Kilo
KIR2DL4	Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4 Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor für Killerzellen 2DL4
LUC	Luciferase
L	Liter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MGMT	06-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2A	NK cell lectin-like receptor subfamily C member 1 NK-Zell-Lectin-like-Rezeptor-Unterfamilie C, Mitglied 1
NKG2D	NK cell lectin-like receptor subfamily K member 1 NK-Zell-Lectin-like-Rezeptor-Unterfamilie K, Mitglied 1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell Periphere mononukleäre Blutzelle
PDHB	Pyruvat-Dehydrogenase Beta
PD-L1	Programmed-Cell Death-Receptor ligand 1 Programmierter Zelltod-Rezeptor-Ligand 1
pGSZ	Primäre Stammzell-angereicherte Glioblastomzellen
real-time RT-PCR	Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rhFGF	Recombinant human basic fibroblast growth factor Rekombinanter menschlicher basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor

rhEGF	Recombinant human epidermal growth factor Rekombinanter menschlicher epidermaler Wachstumsfaktor
RNA	Ribonucleic acid
TAAAs	tumorassozierte Antigene
TCGA	The Cancer Genom Atlas
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TLT-2	Triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript 2 Auslösender Rezeptor, der auf myeloischen Zellen exprimiert wird, wie Transkript 2
TME	Tumor microenviroment
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organisation



## **4. Einleitung**

### **4.1 Glioblastom**

Das Glioblastom zählt zu den diffus infiltrierenden hirneigenen Tumoren. Unter diesen stellt es sich histomorphologisch, wie auch molekulargenetisch, als ein hochmalignes Gliom dar und wird als Grad-4-Gliom nach der „World Health Organisation“ (WHO) klassifiziert (Louis et al., 2021). Das 5-Jahres-Überleben liegt bei 6,8 %. Die Inzidenz pro 100.000/Jahr beträgt 5-6 (Wick et al, 2021).

Zur Diagnosestellung werden neben der radiologischen Bildgebung auch molekularpathologische Verfahren herangezogen. So werden verschiedene molekulare Marker, wie die Isozitatdehydrogenase (IDH) genutzt, um eine Diagnose stellen zu können. Zusätzlich dienen die Analysen zur prognostischen Abschätzung, wie auch zur Auslotung spezifischer Therapien (Louis et al., 2021). Im Allgemeinen besteht die Therapie aus der Kombination der chirurgischen Resektion mit anschließender Radiochemotherapie. Bei der Radiochemotherapie erfolgt eine Strahlentherapie mit maximal 60 Gray (Gy) in 1,8 – 2 Gy Fraktionen mit begleitender und anschließender Temozolomid-Erhaltungstherapie.

### **4.2 Subgruppen des Glioblastoms**

Das Glioblastom ist durch eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität gekennzeichnet (Patel et al., 2014). Dieser Heterogenität versucht man mit verschiedenen Klassifizierungsansätzen zu begegnen. 2010 wurden Gen-Daten aus dem „The Cancer Genom Atlas“ (TCGA) (Cancer Genome Atlas Research, 2008) genutzt, um vier molekulare Subgruppen des Glioblastoms zu unterscheiden: mesenchymal, klassisch, proneural und neural (Verhaak et al., 2010).

Die neurale Gruppe findet jedoch keine Beachtung mehr, da diese sich hauptsächlich aus normalem Hirngewebe mit einstreuenden Tumorzellen zusammensetzt (Wang et al., 2017). Zudem findet dieser Ansatz bisher keine Anwendung im klinischen Alltag.

Es werden aktuell eher andere Indikatoren verwendet, wie der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Status, um prognostische und prädiktive Aussagen treffen zu können (Stupp et al., 2005).

Des Weiteren werden Klassifizierungen diskutiert, welche verschiedene Stammzellmarker berücksichtigen. Diese Ansätze beruhen auf der Annahme, dass Stammzellen mit ihren typischen Markern, wie Aldehyd Dehydrogenase (ALDH), eine entscheidende Rolle in der Therapieresistenz von Tumoren spielen (Battle & Clevers, 2017; Cojoc et al., 2015). Deren Einbeziehung soll prognostische Aussagen ermöglichen und helfen, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Für Glioblastomstammzellen wird -- angelehnt an obige Klassifizierung -- zwischen proneuralen und mesenchymalen Stammzellpopulationen unterschieden (Chandran et al., 2015). Der in dieser Arbeit genutzte Score von Ganser et al. orientiert sich an dieser Einteilung. Neben „*messenger ribonucleic acid*“ (mRNA), also Genexpressionsdaten von Stammzellmarkern, werden zusätzlich Marker für Radioresistenz und Invasivität (z.B. der „Ca<sup>2+</sup>-activated intermediate conductance channels“ (IKCa)) genutzt, um primäre Stammzell-angereicherte Glioblastomzellen (pGSZ) -Kulturen eine proneurale oder mesenchymale Signatur zuzuteilen. Eine eher mesenchymale Signatur ist hierbei mit einer hohen intrinsische Radioresistenz und Invasivität assoziiert. Zudem ist deren Gesamtüberleben im Vergleich zur proneuralen Gruppe vermindert (Ganser et al., 2022).

### **4.3 Immunregulation**

Die komplexe Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen lässt sich vereinfacht mit dem „Cancer-Immunity-Cycle“ beschreiben. In Tumorzellen führen genetische Mutationen, wie auch Störungen in zellulären Regulationsvorgängen u.a. zu einer veränderten Peptidpräsentation an dem humanen Leukozytenantigenen (HLA) Klasse-I-Molekül. Diese Peptidveränderungen können von „Cluster Of Differentiation“ (CD) -8<sup>+</sup> Zellen, wie zytotoxische T-Zellen, erkannt werden und diese aktivieren, was zur Lyse der veränderten Zellen führen kann. Darüber hinaus können dendritische Zellen

freigesetzte Antigene der Tumorzellen aufnehmen. Diese können sie als Antigen präsentierende Zellen (APZ) über HLA-Klasse-II CD-4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren und diese aktivieren, was ebenfalls eine antitumoröse Immunreaktion unterstützt. Wichtig für diese Reaktion sind proinflammatorischen Zytokine wie Interleukin (IL) -1 oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die vermehrt von den aktivierten Immunzellen, wie auch von den sterbenden Tumorzellen freigesetzt werden. Hierdurch wird die gezielte Elimination der Tumorzellen gefördert (Chen & Mellman, 2013; Mellman et al., 2023).

Tumorzellen können mit Hilfe einer Vielzahl verschiedener Mechanismen dieser Immunreaktion entgehen. Besonders wichtig erscheint hier die Etablierung einer immuninhibitorischen „Tumor microenvironment“ (TME), die sich durch Anhäufung von Immunzellen, wie beispielsweise regulatorischen T-Zellen (Wang et al., 2018), „myeloid-derived suppressor cells“ (MDSC) (Yu et al., 2013), dendritischen Zellen (Benencia et al., 2014) oder M2-Makrophagen (Chanmee et al., 2014), auszeichnet. Diese wirken sich durch komplexe Mechanismen, wie z.B. die Absonderung des inhibitorisch wirkenden Zytokins IL-4, hemmend auf eine antitumoröse Immunreaktion des Körpers aus (Hinshaw & Shevde, 2019). Darüber hinaus können Tumorzellen vermehrt sogenannte Immuncheckpoint-Liganden, wie der „programmed-cell death-receptor ligand 1“ (PD-L1) exprimieren. Bei Bindung an den zugehörigen Rezeptor (z.B. „programmed-cell death-receptor“, PD-1) der T-Zelle bewirkt dies eine hemmende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung (Jiang et al., 2019). Zudem können Tumorzellen über eine Herunterregulation von HLA-I einer T-Zellantwort entgehen (Taylor & Balko, 2022).

Aktuelle Therapien interagieren auf verschiedene Weise mit dem immunogenen Verhalten der Tumorzellen. Besonders hervorzuheben sind die Immuncheckpoint Inhibitoren - wie der monoklonale Antikörper Nivolumab - welche spezifisch in die Immunregulation eingreifen. So bindet Nivolumab an den PD-1 Rezeptoren von T-Zellen und verhindert hierdurch deren Hemmung. Erfolgreich wird dieser Antikörper bereits in metastasierten Melanomen (Gupta & Daigle, 2016) und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen verwendet (Q. Huang et al., 2021). Aber

auch immunologisch unspezifisch wirkenden Therapien, wie Chemotherapien, werden immunologische Effekte zugesprochen. Durch den induzierten nekrotischen Zelltod werden vermehrt Antigene frei, welche in einer nachträglichen Aktivierung des Immunsystems mündet (Chen & Mellman, 2013; Mellman et al., 2023). Es ist jedoch hervorzuheben, dass die einzelnen Tumorentitäten sich in ihrem immunogenen Verhalten stark unterscheiden können, weswegen jede Tumorentität im Detail betrachtet werden sollte.

#### **4.4 Immunsuppressive Natur des Glioblastom**

Das Glioblastom wird im Generellen als immunologisch kalter Tumor aufgefasst. Es wird angenommen, dass es sowohl durch die Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen, wie auch durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen zu einer Unterdrückung der Immunantwort kommt (Chuntova et al., 2021). Das Glioblastom rekrutiert immunsuppressiv wirkende Zellen, wie MDSCs, regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und tumorassoziierte Makrophagen. Diese sezernieren immunsuppressive Faktoren, wie den „Transforming growth factor“ (TGF) - $\beta$  and IL-10, die eine Immunantwort auf die Tumorzellen vermindern (Wing & Sakaguchi, 2010). Zusätzlich entwickelt sich eine Immuntoleranz gegenüber dem Glioblastom durch den Ausschluss bzw. die erschwerte Einwanderung von antitumoralen Immuneffektorzellen, wie den T-Zellen (Iglesia et al., 2016). Des Weiteren kann das Glioblastom durch die Expression von inhibitorischen Checkpoint-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche, wie z.B. von PD-L1 oder CD276, eine Immunantwort unterdrücken (Chen et al., 2023; Nduom et al., 2016; Nehama, Di Ianni, Musio, Du, Patané, et al., 2019).

Die genannten Mechanismen könnten die bislang ausbleibenden Erfolge von klinischen Studien der Immuntherapeutika erklären. So zeigen mehrere Phase III-Studien beim Glioblastom keinen Vorteil von Immuntherapien gegenüber den etablierten Behandlungen. So konnte im Vergleich zu dem „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) -Inhibitor Bevacizumab bei Rezidiv-Patienten für die Behandlung mit Nivolumab keine signifikante Überlegenheit bezüglich des

Gesamtüberlebens belegt werden (Reardon et al., 2020). Zudem wurde die fehlende Wirksamkeit von Nivolumab in weiteren Studien im Vergleich oder zusätzlich zu der Standardtherapie mit Temozolomid nachgewiesen (Lim et al., 2022; Omuro et al., 2023). Auch bisherige Versuche zur Tumorstimmung waren beim Glioblastom nicht erfolgreich und führten in einigen Patienten-Subgruppe sogar zu einer Verkürzung des Gesamtüberlebens (Narita et al., 2019; Weller et al., 2017). Darüber hinaus zeigte zwar eine adoptive Zellimmuntherapie mit autologen Zytokin-induzierten Killerzellen eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens von wenigen Monaten, doch ist keine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens nachweisbar (Kong et al., 2017). Zu beachten ist, dass Immuntherapien meist nicht als Monotherapie verwendet werden, sondern in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie.

#### **4.5 Immunogene Effekte ionisierender Bestrahlung**

Lokal ionisierende Bestrahlung kann das TME beeinflussen. Dabei wurden ambivalente Effekte der Bestrahlung auf die Immunantwort gegen den Tumor beschrieben: Einerseits kommt es zur Aktivierung des Immunsystems durch die Freisetzung von (Neo)antigenen. Im Gegensatz dazu werden jedoch auch immunsuppressive Effekte durch die direkte Schädigung von Immunzellen im Bestrahlungsfeld beschrieben. (Jarosz-Biej et al., 2019).

Immunaktivierend wirkt dabei die direkte Tumorzelldestruktion. Der sogenannte immunogene Zelltod führt zur Freisetzung von tumorassoziierten Antigenen (TAAs). Zudem werden „Damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), wie Calreticulin, Adenosintriphosphat (ATP) oder „High-Mobility-Group-Protein B1“ frei. Diese werden von DCs erkannt, welche naive T-Zellen in den anliegenden Lymphknoten aktivieren. Zusätzlich wird die Infiltration des Tumors durch die Kreuzpräsentation der DCs mit CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen verbessert (Gameiro et al., 2014; Kepp et al., 2009; Kulzer et al., 2014; Ma et al., 2013). Auch wird durch die Bestrahlung die Freisetzung von Zytokinen, wie Interferon (IFN)  $\gamma$ , angeregt, was eine T-Zell-Infiltration und Tumorzellerkennung, beispielsweise durch die HLA-I-Hochregulation auf Tumorzellen, bewirkt (Lugade

et al., 2008). Außerdem konnte eine verbesserte Infiltration von chimärer Antigenrezeptor (CAR) T-Zell nach Bestrahlung bei in vitro Modellen von Pleuramesotheliom und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen festgestellt werden (Quach et al., 2023).

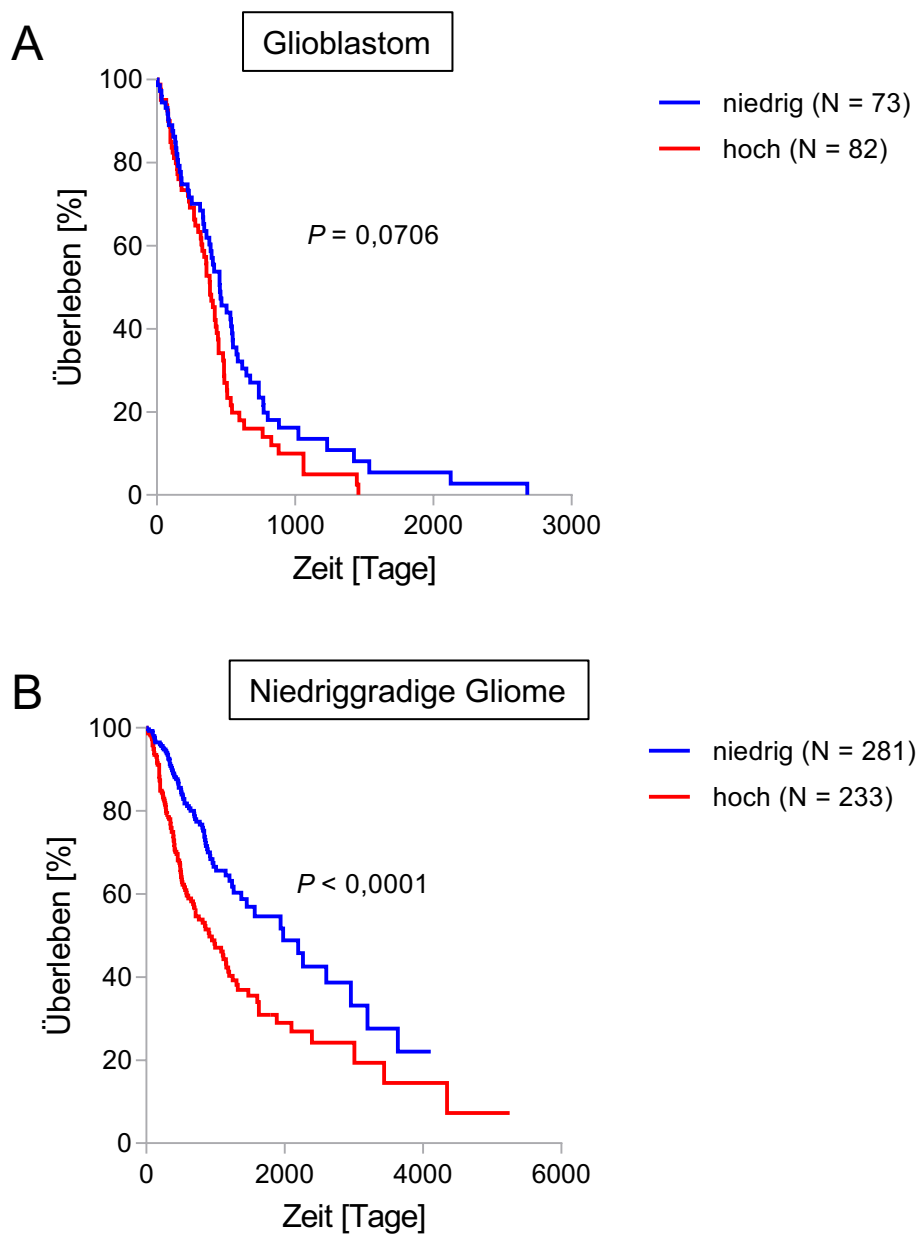
Zu den immunsupprimierenden Prozessen zählen unter anderem die Rekrutierung von immunsupprimierenden Zellen, wie den MDSCs durch den „Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) (Barker et al., 2015). Darüber hinaus können regulatorische T-Zellen rekrutiert werden, die eine immunhemmende Wirkung besitzen. Sie verfügen über eine ausgeprägte Radioresistenz und hemmen die Proliferation von Immun-Effektorzellen (Persa et al., 2015). Zudem sezernieren die genannten Zellen verschiedene immunsuppressive Substanzen, wobei insbesondere TGF- $\beta$  hervorzuheben ist. TGF- $\beta$  reduziert die zytotoxische Wirksamkeit von CD8<sup>+</sup> Zellen, unterdrückt die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung, unterstützt die T<sub>reg</sub> Transformation und inhibiert die Natürliche Killerzell (NK-Zell) -Proliferation (Trapani, 2005; Wrzesinski et al., 2007; Yang et al., 2010).

Weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung ist, inwiefern die Bestrahlungsdosis und das Fraktionierungsschema dieses Gleichgewicht beeinflussen können (Vanpouille-Box, Alard, et al., 2017; Vanpouille-Box, Formenti, et al., 2017). Zudem werden Strategien diskutiert, Immuntherapien mit Tumorbestrahlung zu kombinieren. Das Ziel dieser Strategien besteht in der Aufhebung der Immunsuppression im TME durch Tumorbestrahlung bei gleichzeitiger Steigerung der Immunogenität des Tumors sowie der systemischen antitumoralen Immunantwort (Eckert et al., 2017). Allerdings ist der Einfluss ionisierender Strahlung auf das immunogene Verhalten der verschiedenen pGSZ-Subtypen bislang weitgehend unerforscht.

#### **4.6 Rolle von CD276**

CD276, auch B7 Homolog 3 (B7-H3) genannt, weist sowohl immunregulatorische als auch tumorfördernde Eigenschaften auf. Das menschliche B7-H3 Gen befindet sich auf Chromosom 15. CD276 liegt als transmembrane oder als

lösliche Isoform vor. Die transmembranäre Form von B7-H3 umfasst 316 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 45-66 kDa (Kilodalton) und zählt zu den Typ-I-Transmembranproteinen. Es umfasst jeweils eine extrazelluläre, transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Paaren mit jeweils variabler Immunglobulindomäne und einer konstanten Domäne. Die lösliche Form entsteht entweder durch Abspaltung von der Zelloberfläche oder durch alternatives Spleißen. Die *B7-H3* mRNA-Abundanz ist zwar auch im normalen Gewebe nachweisbar, jedoch ist deren Proteinexpression durch posttranslationale Regulation limitiert. Darüber hinaus konnte in mehreren Tumorentitäten eine Überexpression des Proteins nachgewiesen werden, u.a. im Glioblastom (Nehama, Di Ianni, Musio, Du, Patane, et al., 2019; Zhou & Jin, 2021). In Tumoren korreliert *B7-H3* dabei mit einer aggressiveren Biologie, einer geringeren T-Lymphozyten-Infiltration und einer schlechten Prognose. (Brustmann et al., 2015; Chen et al., 2015) (Abb. 1).



**Abbildung 1: CD276-assoziiertes Gesamtüberleben von Glioblastom- und niedriggradigen Gliom-Patienten**

Gesamtüberlebenskurve von Glioblastom- (A) und niedriggradigen Gliom-Patienten (B) basierend auf TCGA Daten (Smith & Sheltzer, 2022) (extrahiert am 06.12.2023). Stratifizierung der Patienten erfolgte mittels „Ribonucleic Acid“ (RNA)-Sequenzierung in hoher Expression (> mittlere RNA Abundanz, rote Kurven) oder niedriger Expression (< mittlere RNA Abundanz, blaue Kurven). Dargestellte p-Werte wurden mittels Log-rank (Mantel-Cox) -Tests univariat berechnet.



In der Literatur werden verschiedene Funktionen von B7-H3 beschrieben, welche sich in immunabhängige und immununabhängige Wege einteilen lassen. In Bezug auf die immunabhängigen Effekte wird mittlerweile von einem immunhemmenden Effekt von B7-H3 ausgegangen. Dabei reduziert B7-H3 die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell Proliferation, sowie die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  (Prasad et al., 2004; Suh et al., 2003). Zusätzlich wird eine Beeinträchtigung der NK-Zell-Aktivität beschrieben (Castriconi et al., 2004). Als Immuncheckpoint hemmt es das adaptive Immunsystem, indem es die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung inhibiert. Dadurch wird die Immunantwort gegen Tumore vermindert und dessen Immunevasion gefördert (Lee et al., 2017). Ein CD276-Rezeptor konnte beim Menschen bislang noch nicht identifiziert werden. Ein „triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript 2“ (TLT-2) konnte zwar bei Mäusen als Rezeptor für B7-H3 nachgewiesen werden (Hashiguchi et al., 2008), jedoch nicht im Menschen (Leitner et al., 2009). Zu den nicht-immunologischen Funktionen von B7-H3 zählen die Förderung der Angiogenese, die Steigerung des invasiven Wachstums und der Migration, die Verstärkung der chemotherapeutischen Resistenz, die Förderung der epithelialen-zu-mesenchymalen-Umwandlung und die Förderung eines tumorfördernden Stoffwechsels (Kontos et al., 2021). CD276-gerichtete Therapien werden bereits in mehreren klinischen Studien erprobt. Diese umfassen unter anderem die Verwendung von monoklonalen Antikörpern („Checkpoint-Inhibitoren“), Radioimmuntherapien, Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, CD3-aktivierenden spezifischen Antikörpern sowie CAR-T-Zelltherapien (Tab. 1).

**Tabelle 1: Klinische Studien von gegen B7-H3 (CD276)-gerichteter Therapien**

(Literaturrecherche am 16.07.2023)

Versuchsnummer	Titel	Status
NCT04385173	Pilot Study of B7-H3 CAR-T in Treating Patients With Recurrent and Refractory Glioblastoma	RECRUITING
NCT05835687	Loc3CAR: Locoregional Delivery of B7-H3-CAR T Cells for Pediatric Patients With Primary CNS Tumors	RECRUITING
NCT04077866	B7-H3 CAR-T for Recurrent or Refractory Glioblastoma	RECRUITING

NCT05474378	B7-H3 Chimeric Antigen Receptor T Cells (B7-H3CART) in Recurrent Glioblastoma Multiforme	RECRUITING
NCT05241392	Safety and Efficacy Study of Anti-B7-H3 CAR-T Cell Therapy for Recurrent Glioblastoma	RECRUITING
NCT04670068	Phase I Study of Autologous CAR T-Cells Targeting the B7-H3 Antigen in Recurrent Epithelial Ovarian	RECRUITING
NCT04897321	B7-H3-Specific Chimeric Antigen Receptor Autologous T-Cell Therapy for Pediatric Patients With Solid Tumors (3CAR)	RECRUITING
NCT05515185	B7-H3 Targeting CAR-T Cells Therapy for B7-H3 Positive Solid Tumors	NOT YET RECRUITING
NCT05731219	UTAA06 Injection in the Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	RECRUITING
NCT02628535	Safety Study of MGD009 in B7-H3-expressing Tumors	TERMINATED
NCT05562024	TAA06 Injection in the Treatment of Patients With B7-H3-positive Relapsed/Refractory Neuroblastoma	RECRUITING
NCT05722171	Clinical Study of UTAA06 Injection in the Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	RECRUITING
NCT04432649	Targeting CD276 (B7-H3) Positive Solid Tumors by 4SCAR-276	RECRUITING
NCT02982941	Enoblituzumab (MGA271) in Children With B7-H3-expressing Solid Tumors	COMPLETED
NCT03406949	MGD009/MGA012 Combination in Relapsed/Refractory Cancer	COMPLETED
NCT05752877	Safety and Efficacy of Targeted IL-13 R $\alpha$ 2 or B7-H3 UCAR-T for Advanced Glioma	RECRUITING
NCT05366179	Autologous CAR-T Cells Targeting B7-H3 in Recurrent or Refractory GBM CAR.B7-H3Tc	RECRUITING
NCT05190185	A Clinical Trial of TAA06 Injection in Advanced Solid Tumors	RECRUITING
NCT01918930	Tissue Procurement Substudy for Participants in Study CP-MGA271-01	TERMINATED
NCT03729596	MGC018 With or Without MGA012 in Advanced Solid Tumors	TERMINATED
NCT02381314	Safety Study of Enoblituzumab (MGA271) in Combination With Ipilimumab in Refractory Cancer	COMPLETED
NCT03198052	GPC3/Mesothelin/Claudin18.2/GUCY2C/B7-H3/PSCA/PSMA/MUC1/TGF $\beta$ /HER2/Lewis-Y/AXL/EGFR-CAR-T Cells Against Cancers	RECRUITING
NCT04129320	Enoblituzumab Plus MGA012 or MGD013 in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck	WITHDRAWN
NCT04634825	Enoblituzumab Plus Retifanlimab or Tebotelimab in Head and Neck Cancer	TERMINATED
NCT04185038	Study of B7-H3-Specific CAR T Cell Locoregional Immunotherapy for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma/Diffuse Midline Glioma and Recurrent or Refractory Pediatric Central Nervous System Tumors	RECRUITING
NCT05280470	Ifinatamab Deruxtecan (I-DXd) in Subjects With Pretreated Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer (ES-SCLC)	ACTIVE NOT RECRUITING
NCT05768880	Study of B7-H3, EGFR806, HER2, And IL13-Zetakine (Quad) CAR T Cell Locoregional Immunotherapy For Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma, Diffuse Midline Glioma, And Recurrent Or Refractory Central Nervous System Tumors	RECRUITING
NCT05293496	A Study of MGC018 in Combination With MGD019 in Participants With Advanced Solid Tumors	RECRUITING
NCT04842812	Engineered TILs/CAR-TILs to Treat Advanced Solid Tumors	RECRUITING
NCT05276609	ARTEMIS-001: Phase 1 Study of the HS-20093 in Patients With Advanced Solid Tumors	RECRUITING
NCT04637503	4SCAR-T Therapy Targeting GD2, PSMA and CD276 for Treating Neuroblastoma	RECRUITING
NCT05063357	131I-omburtamab Delivered by Convection-Enhanced Delivery in Patients With Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	WITHDRAWN
NCT04544592	UCD19 CarT in Treatment of Pediatric B-ALL and B-NHL	RECRUITING
NCT05914116	A Study of DB-1311 in Advanced/Metastatic Solid Tumors	NOT YET RECRUITING
NCT05064306	131I-omburtamab for the Treatment of Central Nervous System/Leptomeningeal Neoplasms in Children and Young Adults	AVAILABLE
NCT04630769	FT516 and IL2 With Enoblituzumab for Ovarian Cancer	COMPLETED
NCT04743661	131I-Omburtamab, in Recurrent Medulloblastoma and Ependymoma	ACTIVE NOT RECRUITING

## 4.7 Chimäre Antigen Rezeptoren

Chimäre Antigen Rezeptoren sind synthetisch hergestellte Proteine, die nach Kontakt mit einem Zielantigen zu einer Aktivierung der Immunzellen führen. Hierdurch können die Effektor-Funktionen der Immunzellen gezielt gegen Antigen-tragende Zellen (z.B. Tumorzellen) evoziert werden (June et al., 2018). Die Konstruktion der CARs basiert auf vier Hauptkomponenten: einer antigenbindenden Domäne, einem Gelenk, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Signaldomäne. Die antigenbindende Domäne wird dabei in der Regel aus dem kurzkettigen variablen Fragment („short chain variable fragment“, scFV) eines monoklonalen Antikörpers abgeleitet. Die intrazelluläre Signaldomäne leitet sich von der CD3 $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors ab. In CAR-Konstrukten der zweiten Generationen werden zusätzlich Co-Stimulationsdomänen (z.B. CD28 oder 4-1BB) genutzt, um die Signaltransduktion nach Antigenbindung zu erhöhen (Rafiq et al., 2020). Gegenüber einer Antigenerkennung mittels T-Zell-Rezeptor, besitzen CAR T-Zellen den grundlegenden Vorteil einer Unabhängigkeit von Antigenverarbeitungsprozessen mit anschließend notwendiger Präsentation durch HLA-Moleküle (sogenannte HLA-Restriktion). Somit können CAR T-Zellen eine Vielzahl an Antigenen erkennen und neben Protein auch Kohlenhydrate und Glykolipidstrukturen binden (Sadelain et al., 2013). Die Affinität zu ihrem Zielantigen stellt sich als modifizierbarer Faktor dar, um die Therapie spezifisch auf die Tumorzellen zu justieren (Flugel et al., 2023). Etabliert ist die CAR-Technologie bereits in Form von CAR T-Zellen. Sie wird u.a. erfolgreich in der Therapie von behandlungsrefraktären lymphoblastischen B-Zell-Leukämien und von therapierefraktären großzelligen B-Zell-Lymphomen genutzt (Abramson et al., 2020; Maude et al., 2018). Hinderlich ist das immunsupprimierende Milieu im Tumorgewebe, welches zu einer verminderten Infiltration des Tumors und einer gehemmten T-Zell-Aktivität führt (Martinez & Moon, 2019). Überdies stellt sich für die Verwendung von autologen CAR T-Zellen deren umfangreiche und aufwändige Herstellung als Herausforderung dar. Außerdem sind CAR T-Zellen bei soliden Tumoren noch nicht erfolgreich im klinischen Alltag etabliert (Pan et al., 2022). Dabei stellen neben den bekannten zytokinbedingten

Nebenwirkungen (z.B. das „Cytokin release syndrom“, CRS), insbesondere die On-Target/Off-Tumor-Toxizitäten ein Hindernis dar (Flugel et al., 2023). CAR-NK-Zellen weisen distinkte Vorteile auf, die dazu beitragen könnten, die genannten Probleme zumindest teilweise zu lösen.

#### **4.8 Natürliche Killerzellen**

Natürlichen Killerzellen werden klassischerweise zum angeborenem Immunsystem gezählt. Der Großteil der NK-Zellen befindet sich im Blutkreislauf. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr gegen Viren und Tumoren. NK-Zellen entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von ein bis zwei Wochen. Dazu durchlaufen sie einen Reifungsprozess, sodass sie nach dessen Abschluss keine gesunden, körpereigenen Zellen attackieren. NK-Zellen können mithilfe von Granzym B und Perforin Zielzellen direkt lysieren oder mittels Fas-Liganden zur Apoptoseinduktion beitragen. Im Vergleich zu zytotoxischen T-Zellen sind sie in der Lage Tumorzellen zu erkennen, die keine oder nur wenig humane Leukozyten-Antigene-1 (HLA-1) exprimieren. Die Aktivierung von NK-Zellen hängt dabei von einem Gleichgewicht zwischen aktivierenden (z.B. der „NK cell lectin-like receptor subfamily K member 1“, NKG2D) und inhibierenden (z.B. „NK cell lectin-like receptor subfamily C member 1“, NKG2A) Rezeptoren ab. Zusätzlich sind NK-Zellen dazu in der Lage immunmodulierende Zytokine (z.B. IFN- $\gamma$ ) zu sezernieren (Wu et al., 2020).

Ein wesentlicher Vorteil bei der Verwendung von NK-Zellen ist das geringe Risiko der Alloreaktivität. Es ermöglicht die Nutzung von allogenen NK-Zellen aus verschiedenen Quellen, wie den „Peripheral Blood Mononuclear Cell“ (PBMCs), Nabelschnurblut, induzierten pluripotenten Stammzellen und NK-92 Zelllinien. Hierdurch wird die kostengünstige Produktion nach dem „off-the-shelf“ Prinzip möglich (Xie et al., 2020). Im Mittelpunkt der aktuellen Forschung stehen insbesondere die NK-92-Zellen, die bereits in ersten klinischen Studien erprobt werden (Arai et al., 2008).

#### 4.9 NK-92 Zellen

NK-92 Zellen wurden 1994 von einem 50-jährigen Patienten mit einem malignen non-Hodgkin Lymphom isoliert (Gong et al., 1994). Es handelt sich dabei um IL-2-abhängige, kontinuierlich expandierende humane Zellen. Die zytotoxische Wirkung von NK-92 Zellen gegen humane Tumorzellen sind in mehreren Studien belegt. (Tam et al., 1999; Yan et al., 1998). Sie exprimieren nur wenig inhibitorischen Rezeptoren, wie NKG2A, „Human inhibitory receptors Ig-like transcript“ (ILT) -2 und „Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4“ (KIR2DL4). Gleichzeitig verfügen sie über viele aktivierende Rezeptoren, wodurch sie einen aktivierten NK-Zell-Phänotypen besitzen (Maki et al., 2001). Zudem behalten sie ihre zytotoxischen Fähigkeiten auch im hypoxischem Umfeld des TME (Solocinski et al., 2020).

NK-92 Zellen erweisen in klinischen Studien ein besseres Sicherheitsprofil als T-Zellen. Sie zeigen in bisheriger Anwendung ein geringeres Risiko für Graft-versus-Host-Krankheit bei allogener Verabreichung, das hauptsächlich durch das Fehlen des T-Zell-Rezeptors von NK-Zellen erklärt wird (Arai et al., 2008; Kath et al., 2023; Tonn et al., 2013). Auch wurden kein CRS oder Neurotoxizitäten festgestellt. Das Fehlen des CRS ist vermutlich auf ein unterschiedliche Zytokinausschüttung der NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen zurückzuführen. NK-Zellen schütten beispielsweise kein IL-6 bei Aktivierung aus (Burger et al., 2023; Liu et al., 2020).

NK-92 Zellen besitzen eine Zulassung von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) für Phase I- und II-Studien. Vor ihrer Applikation werden diese mit 10 Gy bestrahlt, um eine weitere Proliferation im Patienten zu vermeiden. Ihre zytotoxische Wirkung bleibt dabei zumindest kurzfristig erhalten (S. Grote, G. Urena-Bailen, et al., 2021; Tam et al., 2003; Zhang et al., 2019). Aufgrund der fehlenden Persistenz der NK-92 Zellen, wird mit einer mehrmaligen Applikation der Zellen gerechnet. NK-92 können mit verschiedenen Rezeptoren ausgestattet werden, um deren Effektivität gegen Tumorzellen weiter auszubauen, wobei sich die Implementierung von CAR-Strukturen als vielversprechend erweist.

#### **4.10 CD276-CAR NK-92 Zellen**

CAR exprimierende NK-92 Zellen stellen eine potenzielle Therapieoption gegen Tumoren dar. Sie wurden bereits in ersten Studien bei Glioblastompatienten erprobt (Burger et al., 2023).

Die eingesetzten CAR-Strukturen in NK Zellen ähneln den oben beschriebenen CAR-Konstrukten in T-Zellen mit extrazellulärer scFV für die Antigenerkennung, intrazellulärer CD3 $\zeta$ -Kette (1. Generation) sowie zusätzlicher Co-Stimulationsdomänen wie CD28 oder 4-1BB (2. Generation) (Zhang et al., 2019).

Ihre zytotoxische Wirksamkeit wird durch erste *in vitro* Daten unterstrichen. So können Natürlichen Killerzellen mit dem Chimären-Antigen-Rezeptor gegen CD276 (CD276-CAR NK-92 Zellen) *in vitro* Melanomzellen, wie auch Neuroblastomzellen effektiv lysieren. Die zytotoxische Wirkung bleibt unter Einfluss von dem im TME vermehrt vorkommenden, immunsuppressiv wirkenden Zytokin TGF- $\beta$ , unbeeinflusst. Überdies wird deren CAR-vermittelte Lysefähigkeit nach Bestrahlung kaum beeinflusst (Stefan Grote et al., 2021; S. Grote, G. Ureña-Bailén, et al., 2021).

Auch wenn bislang keine klinische Studien mit CD276-CAR NK-92 Zellen durchgeführt werden, erweisen sich zwei erste Phase I-Studie mit CD33-CAR NK-92 Zellen und „human epidermal growth factor receptor 2“ (HER2) -CAR NK-Zellen als nebenwirkungsarm (Burger et al., 2023; Tang et al., 2018). Weitere Studien mit CAR NK-92 Zellen sind geplant bzw. befinden sich in der Rekrutierungsphase (NCT05528341, NCT02944162, NCT03940833, NCT02742727, NCT02892695, NCT05618925).

#### **4.11 Interaktion ionisierender Bestrahlung mit CD276-CAR NK Zelltherapie**

Die bereits in 1.2.3 erläuterten pro-immunogenen, wie auch immunsuppressiven Effekte von Bestrahlung auf das TME, können prinzipiell die CAR-T, wie auch CAR-NK Zell-Therapien beeinflussen. Dabei erscheinen für die CD276-CAR NK-

Zelltherapie beim Glioblastom mehrere mögliche Bestrahlungseffekte als relevant (Hauth et al., 2021).

Es ist eine vermehrte Expression von NKG2D-Liganden in Glioblastomen nach Bestrahlung festgestellt worden, welche möglicherweise zu einer verbesserten zytotoxischen Wirksamkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen führt (Kim et al., 2006; Weiss et al., 2018). Darüber hinaus ist vermutlich eine Hochregulation von CD276 nach Bestrahlung als Zielantigen im Tumorgewebe hilfreich, die Effektivität der CD276-CAR NK-92 Therapie zu steigern. Eine erhöhte CD276-Expression nach Bestrahlung ist bereits in Prostatakarzinomen nachgewiesen (Zhang et al., 2021).

Klinische Beobachtung sind bisher nur limitiert vorhanden, wobei diese ausschließlich die Interaktion zwischen CAR T-Zellen und Bestrahlungseffekten beschreiben. Dabei sind keine Aggravierungen der Tumorerkrankung bei einer kombinierten Therapie von Bestrahlung und CAR T-Zelltherapien ersichtlich. Des Weiteren lassen beschriebene Einzelfälle synergistische Effekte bei therapierefraktären/rezidivierenden diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und therapierefraktären Myelom Patienten vermuten (Qu et al., 2020; Smith et al., 2019). Auch wird die Strahlentherapie als mögliche Salvage Therapie bei Progression der Tumorerkrankung nach einer CAR T-Zell Therapie diskutiert (Imber et al., 2020).

#### **4.12 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es die Abhängigkeit der CD276-CAR NK-Zelltherapie vom Zielantigen zu untersuchen. Zudem soll der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Expression von CD276 auf die pGSZ-Kulturen untersucht werden. Dabei soll geprüft werden, ob die Bestrahlung der Zielzellen die Aktivität CD276-CAR NK-92 Zellen moduliert. Die Arbeit soll die Entwicklung möglicher Therapiestrategie für die Behandlung vom Glioblastomen mit einer CD276-CAR NK-92 Zelltherapie unterstützen.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Herkunft der Zellen

Als Zielzellen verwendet wurden pGSZ – Kulturen, die aus Tumorpräparaten von Patienten am Uniklinikum Tübingen isoliert wurden. Die Gewinnung der Proben erfolgte durch die Neurochirurgische Abteilung der Universität Tübingen nach Einverständnis der Patienten und der zuständigen Ethikkommission (Projekt Nr. 579 / 2015BO2).

Die weitere Isolierung und Kultivierung erfolgte durch die Abteilung der experimentellen Radioonkologie und wurde von Andreas Riedel bzw. Lukas Klumpp durchgeführt (Riedel et al., 2021). Darüber hinaus wurden die pGSZ-Kulturen anhand molekularer Stammzellmarker in eine mesenchymale und proneurale Gruppen klassifiziert (Ganser et al., 2022). Aus beiden Gruppen wurden zwei Kulturen (proneural: AR6 und LK11; mesenchymal: LK7 und LK31) für die weiteren Analysen genutzt, sowie eine Zelllinie (LK17), die keiner Gruppe klar zuzuordnen war.

Im Vorfeld wurde in Zusammenarbeit mit der Hämatologischen und Onkologischen Abteilung der Kinderklinik der Universitätsklinik Tübingen eine pGSZ-Kultur etabliert, welche ein grünfluoreszierendes Protein (GFP) und Luciferase (LUC) exprimieren (LK17 GFP/LUC). Selbige Abteilung stellte auch die CD276-CAR NK-92 Zellen, wie auch parentale NK-92 Zellen ohne Chimären-Antigen-Rezeptor, die im Folgenden als Effektorzellen verwendet wurden. Details zur Transduktion des chimären Antigenrezeptors wurden ebenfalls vorab beschrieben (Stefan Grote et al., 2021) . Das transfizierte zweite Generations-CAR-Konstrukt enthielt einen EF1 $\alpha$ -Promotor, eine CD8-Gelenkdomäne, eine CD28-Transmembrandomäne und die zytoplasmatischen CD28-Ko-Stimulations- sowie CD3- $\zeta$ -Signalldomäne. Der scFv Teil stammte von einem B7-H3 Klon m851 (Stefan Grote et al., 2021).



## 5.2 Zellkultur

Die pGSZ-Kulturen wurden in humanem NeuroCult NS-A Proliferationsmedium (einschließlich 10 ng/mL „recombinant human basic fibroblast growth factor“ (rhFGF), 20 ng/mL „recombinant human epidermal growth factor“ (rhEGF) und 2 µg/mL Heparin; STEMCELL Technologies, #05751, #78003, #78006.2, #07980) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Effektorzelllinien (NK-92, CD276-spezifische CAR NK-92) wurden in MEM $\alpha$  Medium (Thermo Fisher, #32561-029) kultiviert, das mit 20 % „fetal calf serum“ (FCS) und 100 IU/mL IL-2 (R & D Systems, #202-IL-050/CF) supplementiert wurde. Bei Bedarf wurden die Zellen 5-10 Minuten lang enzymatisch mit Accutase (Sigma-Aldrich, #A6964) dissoziiert und die Zellzahlen mit Hämocytometer-Chips (Neubauer Zählkammer) bestimmt.

## 5.3 Bestrahlung

Die pGSZ-Kulturen wurden mit Hilfe eines Linearbeschleunigers (LINAC SL25, Elekta, Stockholm) mit 6 MV-Photonen mit einer Dosisrate von 5,5 Gy/min und bei Raumtemperatur bestrahlt. Je nach Experiment variierte die applizierte Gesamtdosis von 0 bis 16 Gy, wie auch der Zeitpunkt der Bestrahlung vor dem anschließenden Experiment.

## 5.4 RNA-Isolierung und real-time RT-PCR

Die RNA wurde mit dem NucleoSpin RNA-Isolationskit (Macherey-Nagel, #740955.250) gemäß der Anweisungen des Herstellers isoliert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Nanodrop ND-100 verwendet und jeweils 20 ng (Nanogramm) RNA pro Probe eingesetzt. Die einstufige SYBR Green-basierte „real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction“ (real-time RT-PCR,) wurde mit dem 1 Step real-time qPCR Green ROX L Kit (highQu) durchgeführt. Die verwendeten Fragmente waren spezifisch für (alle Quantitect Primer Assays, Qiagen): CD276 (QT00013608), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (QT01192646),  $\beta$ -Actin (ACTB) (QT00095431), Pyruvat-Dehydrogenase beta (PDHB) (QT00031227). Die PCR wurde auf einem LightCycler480 (Roche)-Gerät durchgeführt und die Daten mit der LightCycler

480-Software (Version 1.5.0) analysiert. Die mRNA-Häufigkeiten wurden auf die geometrischen Mittelwerte der Housekeeper-Gene (GAPDH, ACTB, PDHB) normalisiert.

## **5.5 Durchflusszytometrie**

Die Oberflächenexpression von CD276 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden FITC-gekoppelte Antikörper spezifisch für CD276 (Miltenyi Biotec, #130-124-217) oder eine Isotypkontrolle (Miltenyi Biotec, #130-123-667) verwendet. Die Verdünnung der Antikörper betrug 1:50 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 4° C in Dunkelheit. Zum Ausschluss toter Zellen, wurde jeweils 20 µg/mL Propidiumiodid (PI; Sigma Aldrich, #P4864) angewendet und nur PI-negative Zellen gegatet. Alle durchflusszytometrischen Experimente wurden mit einem „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) Calibur-Zytometer (BD) durchgeführt und mit der FCS-Express-3-Software (Version 3.00.0825, De Novo Software) ausgewertet. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um geometrische Mittelwerte der einzelnen Antikörper, die von den geometrischen Mittelwerten der jeweiligen Isotypkontrolle abgezogen wurden.

## **5.6 Zytotoxizitätstest**

Die Lyseaktivität der Natürlichen Killerzellen (Effektorzellen) nach Inkubation mit den Glioblastomstammzellen (Zielzellen) wurde mittels Calcein Release Assay quantifiziert. Die Zielzellen wurden mit 9 µmol/L Calcein-AM (Thermo Fisher, C3100MP) in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI-Medium, das mit 2 % „Fetal calf serum“ (FCS) supplementiert wurde, 50 Minuten lang inkubiert. Nach dem Auswaschen des restlichen Calcein-AM mittels dreimaliger Zentrifugation (250 g, 5 Minuten) und Verwerfens des Überstandes, wurden 5000 Zielzellen mit (CAR) NK-92-Zellen (in unterschiedlichen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzelle) in 200 µL RPMI-Medium, ergänzt mit 2 % FCS, für 2 Stunden ko-inkubiert. Nach Zentrifugation (250 g, 5 Minuten) wurden 100 µL des Überstands abgenommen und die Calcein-Freisetzung mittels Messung der

Fluoreszenz an einem Spark-Multimode-Mikroplattenlesegerät (Tecan) ermittelt. Die spontane Calcein-Freisetzung wurde nur mit Target-Zellen gemessen (ohne Co-Inkubation mit Effektorzellen), während zur Bestimmung der quantitativen (vollständigen) Calcein-Freisetzung Zielzellen mit 2 % Triton inkubiert wurden. Die spezifischen Lyseraten der Effektorzellen berechnete sich wie folgt:

$$\text{spezifische Lyse} = \frac{FI (\text{Probe}) - FI (\text{spontane Freisetzung})}{FI (\text{Triton Freisetzung}) - FI (\text{spontane Freisetzung})}$$

(FI = Fluoreszenzintensität)

## 5.7 Knockdown-Experimente

Die pGSZ-Kulturen wurden mit „small-interfering“-RNA (siRNA) - Oligonukleotiden, spezifisch für CD276 und einer nicht zielgerichteten Kontrolle (NT = „non-targeting“) (jeweils Horizon Discovery; L-007813-01-0005, D-001810-10-05), mit Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher, 13778075) gemäß der Anleitung des Herstellers zur reversen Transfektion transfiziert. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden für jedes siRNA-Oligonukleotid optimiert. Letztlich wurden die Zellen mit 20 nM versetzt und 72 Stunden inkubiert. Die Wirksamkeit des Gen-Knockdowns wurde bei jedem Experiment mittels Durchflusszytometrie evaluiert.

## 5.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Lyseaktivität der CAR-NK92-Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie qualitativ dargestellt. Verwendet wurde ein Axiovert 25 Mikroskop (Carl Zeiss AG; Deutschland; Lichtquelle HBO 50/AC; Osram; Deutschland) sowie eine Canon EOS 1000D Kamera (Canon, Japan). Mit Hilfe der Software EOS-Utility (Canon, Japan) wurden die Parameter reguliert. Jedes GBM-Sphäroid wurde über 72

Stunden beobachtet und mit einem Fluoreszenzfilter oder im Hellfeld mit entsprechenden Beleuchtungszeiten von 0,3 bis 1/15 Sekunden aufgenommen.

## 5.9 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung wurde mit GraphPad Prism (Version 9.4.1) und RStudio (Version 1.4.1106) durchgeführt. Es wurden der Mittelwert und Standardfehler für alle Daten berechnet. Für die Signifikanztestung bei zwei Gruppen wurde der korrigierte zweiseitige T-Test angewendet. Bei Gruppen mit mehr als zwei Proben wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis ANOVA-Test genutzt.

## 5.10 Materialien

### 5.10.1 Chemikalien

*Tabelle 2: Chemikalien*

Chemikalien	Firma
70 % Ethanol	SIGMA-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	BioLegend®, Koblenz
Fetal calf serum (FCS 100 %)	Biochrom AG, Berlin
Heparin	STEMCELL Technologies, Deutschland
Isopropanol	SAV LP GmbH, Flintsbach, Deutschland
NeuroCult™ NS-A Basal Medium	STEMCELL Technologies, Deutschland
NeuroCult™ Proliferation Supplement	STEMCELL Technologies, Deutschland
rhFGF	STEMCELL Technologies, Deutschland
rhEGF	STEMCELL Technologies, Deutschland
Nuclease-free water NucleoSpin® RNA Kit	highQu, Kraichtal
RNAse-free water	highQu, Kraichtal
Real-time qPCR Mix (2x)	highQu, Kraichtal
RT3 Mix	highQu, Kraichtal
1Step real-time qPCR Green ROX L Kit	highQu, Kraichtal
β-Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich, München
FITC-gekoppelte Antikörper (CD276)	Miltenyi Biotec

FITC-gekoppelte Antikörper (Isotypkontrolle)	Miltenyi Biotec
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich, München
Calcein-AM	Thermo Fisher
Triton	
siRNA-Oligonukleotide (CD276)	Horizon Discovery
siRNA-Oligonukleotide (Isotypkontrolle)	Horizon Discovery
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher

## 2.10.2 Labormaterialien

*Tabelle 3: Labormaterialien*

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Hämozytometer-Chips (Neubauer Zählkammer)	Webcraft GmbH, Gottmadingen
Eppendorf Pipette Research	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Tips	Eppendorf, Hamburg
Falcon® Tube 15 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Falcon® Tube 30 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
IBS Integra Biosciences Pipetboy acu	Integra Biosciences, Hudson
Polyvinylidenfluoridmembran	Carl Roth, Karlsruhe
Safe-Lock Tubes 0,5 ml PCR Clean	Eppendorf, Hamburg
TC-Zellkulturflasche T25Stand, Vent. Cap	SARSTEDT, Nümbrecht
TC-Zellkulturflasche T75Stand, Vent. Cap	SARSTEDT, Nümbrecht
Microplate, 96 Well. PS. V-Boden, transparent	Sigma Aldrich, München

### 2.10.3 Geräte und Software

Tabelle 4: Geräte und Software

Geräte /Software	Firma
Bestrahlungsgerät LINAC SL25	Elekta, Stockholm
Spark-Multimode-Mikroplattenlesegerät	Tecan
Durchflusszytometer, FACS-Calibur	Becton Dickinsons, Heidelberg
FCS Express-3-Software	De Novo Software
Fluoreszenz Mikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego
RStudio	Posit PBC
Inkubator HERA cell 240	ThermoScientific TMZ, Dreieich
Lichtmikroskop (Zellkultur), Wilovert S	Hund Wetzlar, Wetzlar
LightCycler 480 R System	Roche, Deutschland
Sterilbank	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorft, Hamburg

## 6. Ergebnisse

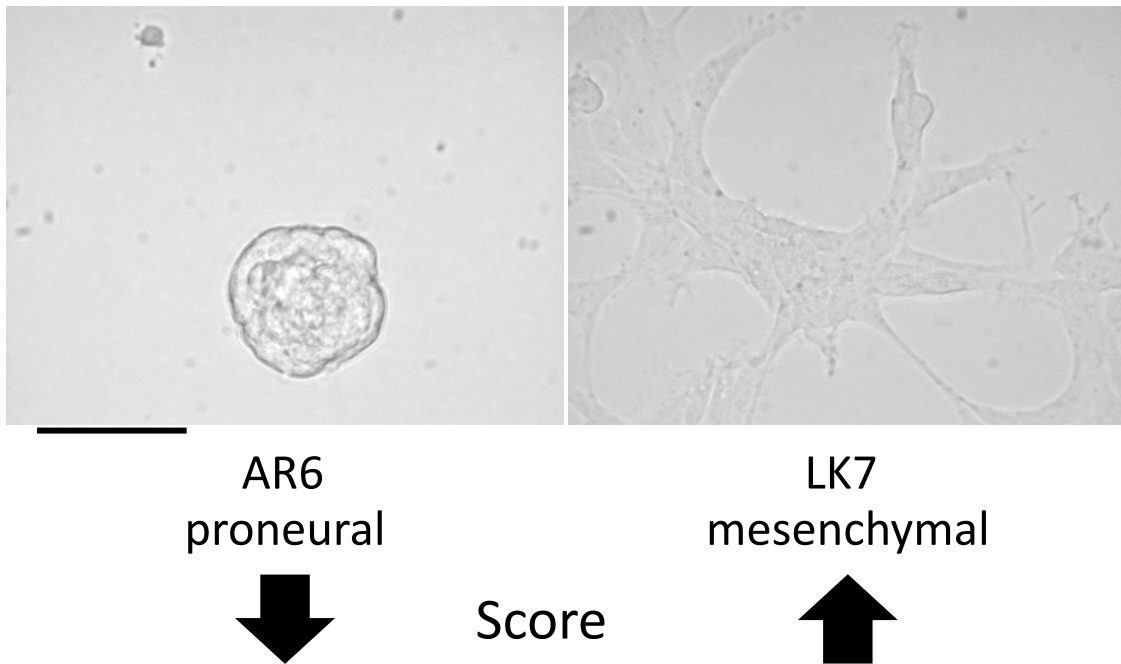
Teile der dargestellten Ergebnisse wurden bereits in dem Originalartikel „Chimeric antigen receptor NK-92 cell function is modulated by HLA class I expression of target cells“ (Stransky et al., 2024) zur Veröffentlichung eingereicht. Dies betrifft Abb. 3 (E), 4 (A, B, D, E) und 11.

### 6.1 Charakterisierung der patientenstämmigen Stammzell-anreichernde Glioblastomkulturen

Die pGSZ-Kulturen individueller Patienten unterschieden sich in der Expression molekularer Marker und dem Wachstumsverhalten, obwohl diese unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. In einer früheren Arbeit wurde deswegen zur Klassifizierung ein Score ermittelt, der verschiedene Stammzellmarker sowie Invasionsmarker nutzt, um die pGSZ-Kulturen in Subgruppen einzuteilen. Analog zum Score zeigen die verwendeten pGSZ-Kulturen unterschiedliche Wachstumsmuster, wie eine Tendenz zum adhärenenten Wachstum von mesenchymaleren Zellen sowie sphäroidalem Wachstum von proneuralen Zellen (Abb. 2 angelehnt an (Ganser et al., 2022)).

Im ersten Schritt wurden die Subgruppen im Hinblick auf ihre *CD276*-mRNA Abundanz mittels realtime RT-PCR untersucht. Es zeigte sich eine konstante mRNA-Abundanz über alle pGSZ-Kulturen hinweg (Abb. 3, A).

Da für die Erkennung durch CAR NK-Zellen lediglich die Oberflächenexpression des Zielantigens relevant ist, wurde die *CD276* spezifische Fluoreszenz der pGSZ -Kulturen mittels Durchflusszytometrie gemessen und abzüglich des unspezifischen Isotyp-Signals berechnet (Abb. 3, B-E). Diese unterschieden sich deutlich voneinander. LK7 und LK31 zeigten die höchsten Expressionswerte, gefolgt von LK17 und LK 11. AR 6 besaß die geringsten Expressionswerte (Abb. 3 E).



### Abbildung 2: Subtypen des Glioblastoms

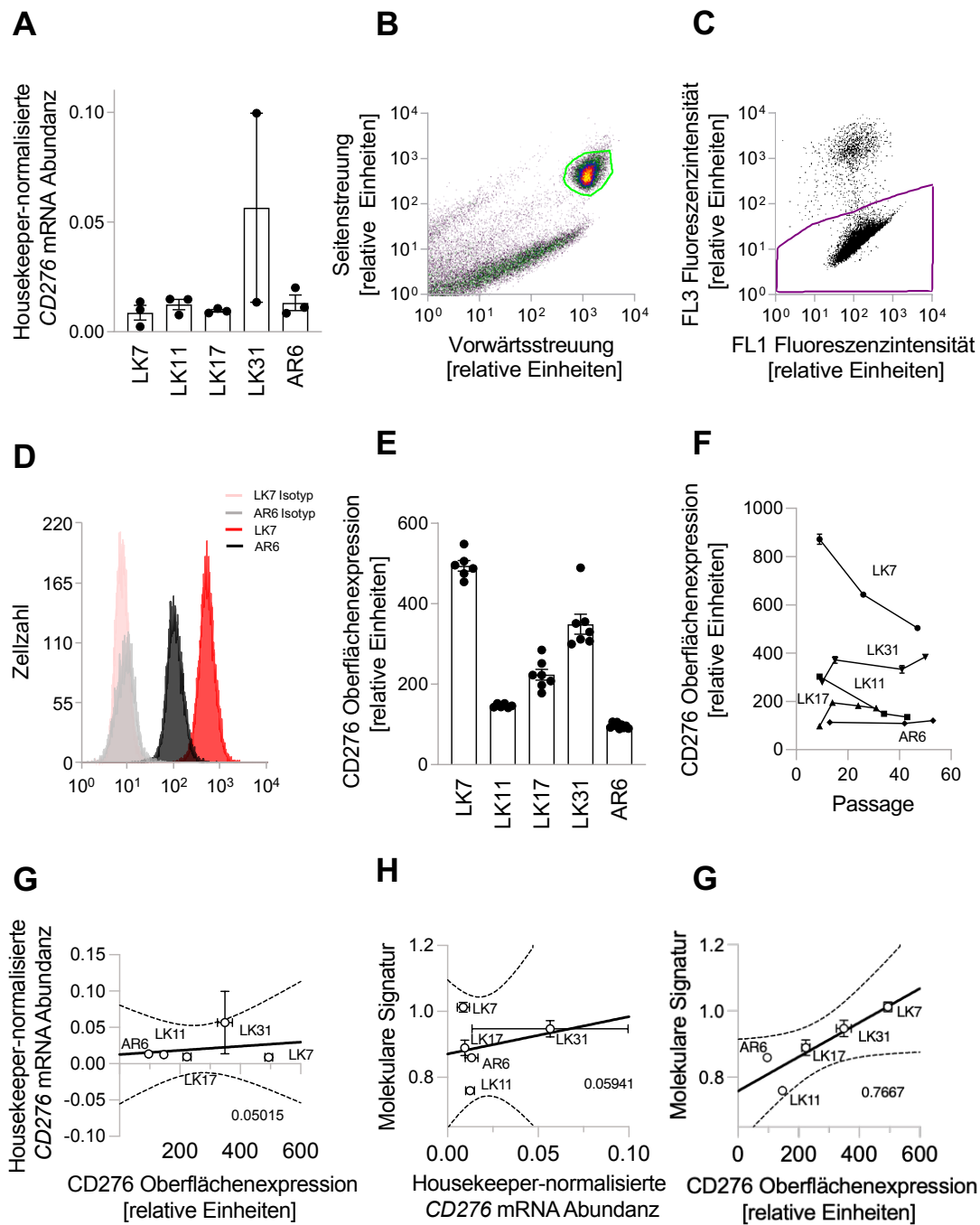
Unterschiedliches Wachstumsverhalten von proneuralen und mesenchymalen Glioblastom-Kulturen. Repräsentative Bilder von LK 7 (rechts) und AR6 (links) pGSZ-Kulturen in NSC-Medium (Lichtmikroskopische Aufnahme, Balken = 100  $\mu\text{m}$ )

Bei den einzelnen Zellkulturen wurden zum Teil starke Schwankungen der CD276-Oberflächenexpression über die Passagen festgestellt. LK11 zeigte dabei einen Rückgang der Oberflächen-Expressionswerte mit steigender Passagenzahl um ca. 55 %, wobei diese sich zuletzt konstant auf einem niedrigeren Niveau hielten. Die Expressionswerte von LK31 stiegen um ca. 38 %. LK7 zeigte einen starken Rückgang der Expressionswerte um 42 %, wobei es trotzdem die höchsten Expressionslevel beibehielt. Für AR6 wurden die geringsten Expressionswerte festgestellt. (Abb. 3, F)

Die CD276-Oberflächenexpression wurde auf eine mögliche Korrelation mit der CD276-mRNA Abundanz untersucht. Diese zeigten keine Korrelation (Pearsonkorrelationskoeffizient  $k \approx 0,050$ ; Abb. 3 G). Darüber hinaus wurde die CD276-mRNA Abundanz, wie auch die CD276-Oberflächenexpression, in eine Korrelation mit dem oben genannten molekularen Score gebracht. Während die CD276-mRNA Abundanz nicht mit dem Score korrelierte ( $k \approx 0,059$ ; Abb. 3, H),



ergab sich eine starke Korrelation der CD276 Oberflächenexpressionen mit einem hohen molekularen Score ( $k \approx 0,77$ ; Abb. 3, I). Zusammenfassend zeigten mesenchymale pGSZ-Kulturen (LK7 und LK31) eine höhere CD276 Oberflächenexpression im Vergleich zu proneuralen pGSZ Kulturen (AR6 und LK11; Abb. 3, E-F, I). Das Verhältnis zwischen den mesenchymalen und proneuralen pGSZ-Kulturen blieb dabei weitestgehend konstant. Dabei behielten mesenchymale pGSZ-Kulturen durchgehend höhere Expressionswerte als proneuralen pGSZ-Kulturen (Abb. 3, F).



**Abbildung 3: CD276 Expressionsprofil der pGSZ-Kulturen**

Mesenchymale pGSZ-Kulturen zeigen eine erhöhte CD276 Oberflächenexpression (**A**) Vergleich der Housekeeper-normalisierten CD276-mRNA Abundanz zwischen pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31 und AR6. Die CD276-mRNA Abundanz wurden mittels real-time RT-PCR ermittelt. (**B,C**) Schematische Darstellung der Gatingstrategie. Grünes Gate (**B**) zur Identifizierung der Zellen, sowie violettes Gate (**C**) zeigt Propidiumiodid-negative und damit lebende Zellen. (**D**) Repräsentative Histogramme zeigen die

spezifische Fluoreszenz des anti-CD276 Antikörpers und der IgG Isotypkontrolle für LK7 und AR6. **(E)** Vergleich der spezifischen CD276 Oberflächenexpression zwischen den pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31 und AR6. Die spezifische CD276-Fluoreszenz wurde in der Durchflusszytometrie mit einem *CD276* spezifischen Antikörper (i.e., anti-CD276 AK-Signal abzüglich des Isotyp-Signals) berechnet. **(F)** Kulturpassagen-abhängige spezifischen CD276-Oberflächenexpression der pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31 und AR6. **(G)** Abhängigkeit zwischen CD276 Oberflächenexpression und der Housekeeper-normalisierten *CD276*-mRNA Abundanzen **(H)** Abhängigkeit zwischen der molekularen Signatur und der Housekeeper-normalisierten *CD276*-mRNA Abundanzen. **(I)** Korrelation zwischen der molekularen Signatur und der *CD276* Oberflächenexpression. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (in A, E) aus 2-9 experimentellen Replikaten, sowie Einzelwerte (in A, E). In den Korrelationsdiagrammen werden jeweils die Standardfehler, die Koeffizienzkurve und der Korrelationskoeffizienzwert gezeigt (D-F).

## 6.2 CAR NK-92 Zellaktivität

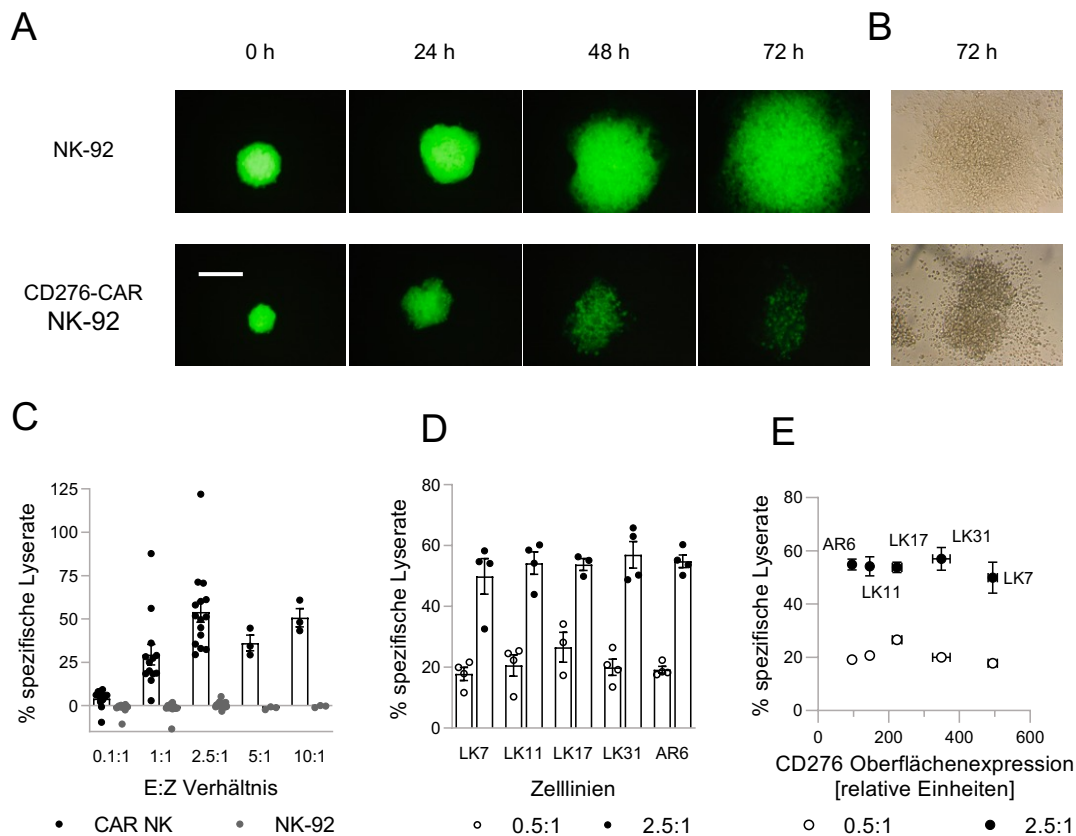
Anschließend erfolgte die Analyse der zytotoxischen Wirkung von CD276-CAR NK-92 Zellen bei Ko-Inkubation mit den pGSZ-Kulturen. Die verwendeten NK-Zellen wurden uns freundlicherweise von der Tübingen Kinderklinik AG Schleicher zur Verfügung gestellt, welche bereits bei der Ko-Inkubation mit Neuroblastomen eine zytotoxische Wirksamkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen zeigen konnten (Stefan Grote et al., 2021).

Zur bildlichen Darstellung der Lyseaktivität wurden Tumorzellsphäroide von GFP-exprimierenden LK17 Zellen ausgesät und mit CD276-CAR sowie parentalen NK-92 Zellen ko-inkubiert. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen zeigten deutliche Anzeichen einer Tumorzelllyse bei Ko-Inkubation mit CD276-CAR NK-92 Zellen, sowie fehlende Lyse durch parentale NK-92 Zellen (Abb. 4 A, B).

Die Lyseaktivität der CAR NK-Zellen wurde mittels Calcein Release Assay quantifiziert, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Zielzellen herzustellen (Neri et al., 2001). Als Grundlage für die folgenden Versuche wurde zunächst das Effektor-Zielzell-Verhältnis (E:Z-Ratio) an LK17 Zellen mit CD276-CAR NK-92 Zellen und NK-92 Zellen untersucht (Abb. 4, C). Unter den

Versuchsbedingungen (u.a. bis zu einer E:Z-Ratio von 10:1) wurde keine Lyseaktivität der NK-92 Zellen gegen die pGSZ-Kulturen festgestellt. Für die E:Z-Ratio der CD276-CAR NK-92 Zellen zeigte sich, dass sich das 2,5:1 E:Z-Ratio nicht signifikant von der 5:1 E:Z-Ratio ( $p = 0,2091$ ) und auch nicht von der 10:1 E:Z-Ratio ( $p = 0,8089$ ) unterschied. Um mögliche technische Effekte von biologischen Effekten zu unterscheiden, wurden in den folgenden Untersuchungen zwei E:Z-Ratio (2,5:1 E:Z-Ratio und 0,5:1 E:Z-Ratio) genutzt.

Im nächsten Schritt wurde die Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen in Ko-Inkubation mit den verschiedenen pGSZ-Kulturen untersucht. (Abb. 3D) Die spezifischen Lyseaktivitäten unterschieden sich wie erwartet für die unterschiedlichen E:Z-Ratio bei allen pGSZ-Kulturen. Für das 2,5:1 E:Z-Ratio zeigten sich ungefähr 2 bis 2,9 mal höhere Lyseraten als für das 0,5:1 E:Z-Ratio. Die CD276-CAR NK-92 Zellen lysierten die verschiedenen pGSZ-Kulturen gleichwertig für beide E:Z-Ratio. Zuletzt wurden die Ergebnisse der beiden E:Z-Ratio dann mit den bereits gemessenen CD276 Oberflächenexpression aus Abbildung 2. in ein Verhältnis gebracht (Abb. 4, E). Eine höhere CD276 Oberflächenexpression hatte überraschenderweise keinen Einfluss auf die Lyseaktivität. Beispielsweise zeigte sich, dass obwohl LK7 eine in etwa 5-fach höhere Oberflächenexpression als AR6 besaß, beide Zellgruppen in beiden E:Z-Ratio gleichwertig lysiert wurden.



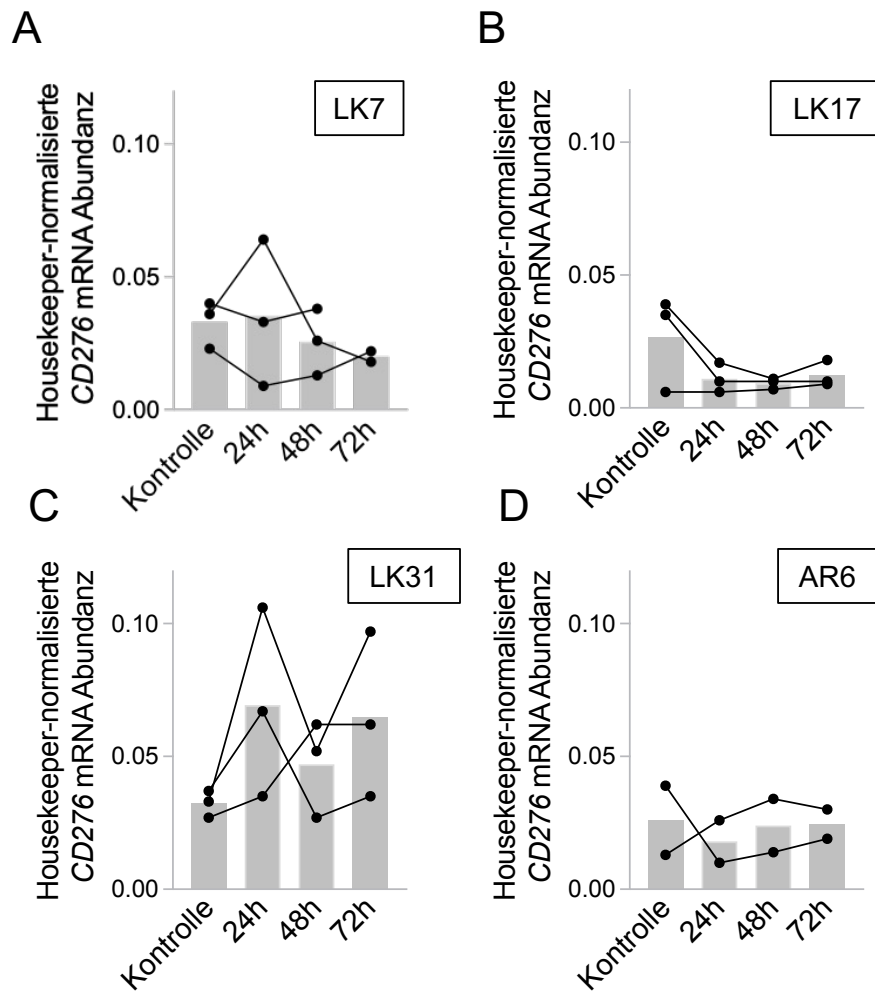
#### Abbildung 4: CAR NK Lyseaktivität

CD276-CAR NK-92 Zellen lysieren unabhängig von der CD276-Oberflächenexpression und des proneural-zu mesenchymalen Subgruppentyps. **(A)** pGSZ-Kulturen (GFP-exprimierende LK17) wurden zusammen mit NK-92 Kontrollzellen (oben) bzw. CD276-CAR NK-92 Zellen (unten) über 72 Stunden beobachtet (Balken entspricht 100  $\mu$ m) **(B)** Durchlichtbild der Zellen aus **(A)** nach 72 Stunden Ko-Inkubation **(C)** Spezifische Lyserate der CD276-CAR NK-92 Zellen und NK-92 Zellen nach Ko-Inkubation mit LK17 Zellen. Das E:Z-Ratio betrug entweder 0,1:1, 1:1, 2,5:1, 5:1 oder 10:1. **(D)** Vergleich der spezifische Lyserate der pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31, und AR6 nach Ko-Inkubation mit den CD276-CAR NK-92 Zellen. Das E:Z-Ratio betrug entweder 0,5:1 oder 2,5:1. **(E)** Verhältnis der CD276 Oberflächenexpression zur spezifischen Lyserate der pGSZ-Kulturen LK 7, LK11, LK17, LK31 und AR6 nach Ko-Inkubation mit CD276-CAR NK-92 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardfehler aus 3 - 17 experimentellen Replikaten sowie Einzelwerte (in C-E).

### 6.3 Bestrahlungseffekte auf Genexpression

Viele verschiedene Entitäten von soliden Tumor, wie Adenokarzinome oder auch neurologische Tumore, zeigen im Vergleich zu Normalgewebe eine erhöhte Expression von CD276 (Guo et al., 2023; Kontos et al., 2021). Wie deren Expression sich nach Bestrahlung im Glioblastom verhält, ist bisher jedoch unbekannt. Im folgenden Schritt wurde die Housekeeper-normalisierte CD276-mRNA Abundanz nach Bestrahlung bestimmt. Es wurden LK7, LK17, LK31 und AR6 Zellen mit 8 Gy bestrahlt und 24, 48 und 72 Stunden später mittels real-time RT-PCR analysiert (Abb. 5).

Alle Zellkulturen bestätigen die bereits gemessenen Werte (s. Abb. 3). Die Vorbestrahlung veränderte die Abundanzen auch nach 72 h nicht wesentlich. Im Kruskal-Wallis-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Abundanzen für alle Zellkulturen gemessen werden (Kruskal-Wallis:  $p > 0,05$  bei LK7, LK17, LK31 und AR6). Wie zuvor bereits festgestellt wurde, zeigten die Werte bei LK31 große Schwankungen. (Abb. 5)



### Abbildung 5: PCR Kinetik

Strahleninduzierte Änderung der CD276-mRNA Abundanz in pGSZ-Kulturen. (A, B, C, D) Die Housekeeper-normalisierten CD276-mRNA-Abundanzen von LK7, LK17, LK31 und AR6 wurden im Zeitraum von 0 bis 72 Stunden nach einer Bestrahlung mit 8 Gy mittels real-time RT-PCR ermittelt. Als Kontrolle dienen unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der einzelnen Experimente.

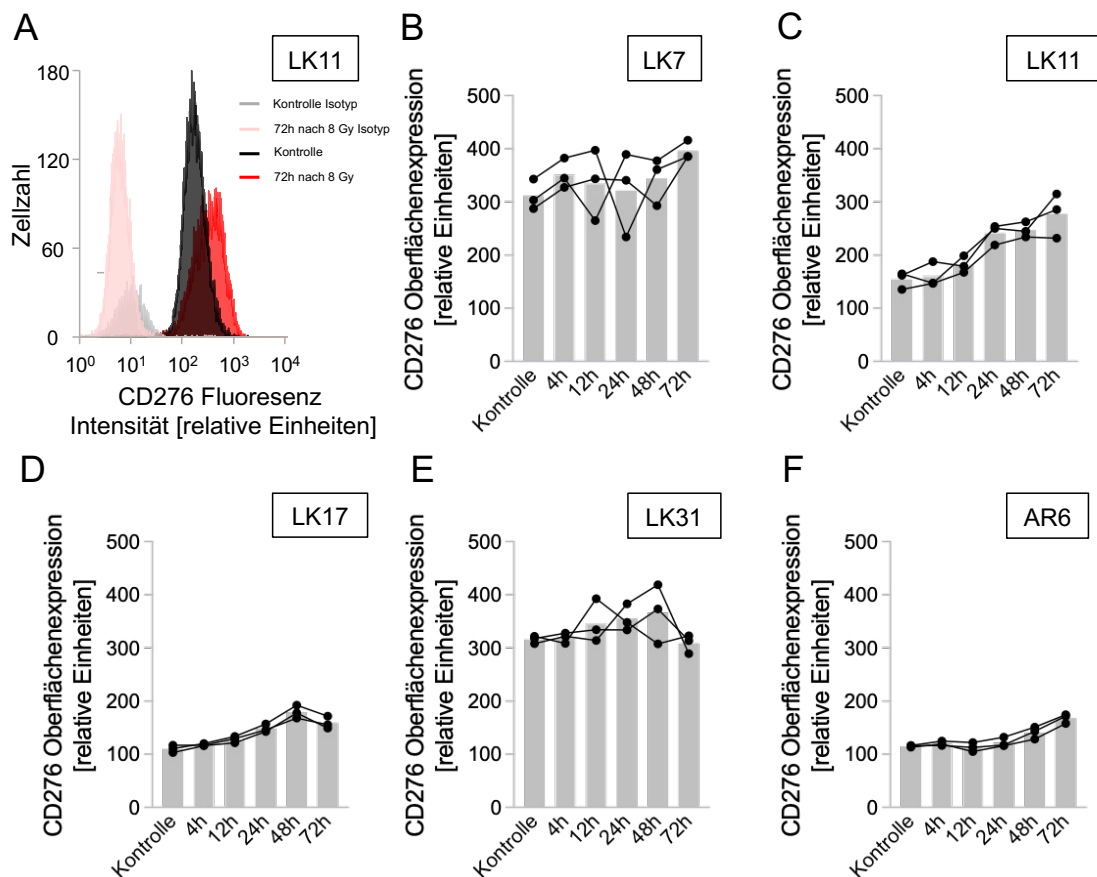
## 6.4 Bestrahlungseffekte im FACS

### 6.4.1 Bestrahlungskinetik

Als nächstes wurde der Einfluss von Bestrahlung auf die gemessene CD276 Oberflächenexpression für die pGSZ-Kulturen untersucht. Es wurden die verschiedenen pGSZ-Kulturen mit 8 Gy bestrahlt und 4, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung mittels Durchflusszytometrie auf ihre CD276 Oberflächenexpression untersucht (Abb. 6).

Auch hier zeigten die mesenchymalen Zellkulturen (LK7 und LK31) deutliche höhere CD276 - Oberflächenexpression als die proneuralen (LK11 und AR6) Kulturen. Dabei wurden jedoch bei LK7 niedrigere Startwerte als in den Vorversuchen festgestellt (vgl. Abb. 3). Alle pGSZ-Kulturen zeigten einen Anstieg der CD276-Oberflächenexpression, wobei bei LK11, LK17 und AR6 ein statistisch signifikanter Anstieg nachgewiesen wurde (Kruskal-Wallis: LK7:  $p = 0,2967$ ; LK31:  $p = 0,2588$ ; LK11:  $p = 0,01557$ ; AR6:  $p = 0,02427$ ; LK17:  $p = 0,007345$ ). Für LK7 wurde eine geringe relative Steigerung der CD276 Oberflächenexpression um bis zu 27 % gemessen, wie auch bei LK31 mit bis zu 16 %. Eine moderate Steigerung zeigten AR6 mit bis zu 45 % und LK17 mit 63 %. Den größten Anstieg zeigte LK11 mit etwa 81 %. LK7, LK11 und AR6 zeigten nach 72 Stunden die höchste Expressionswerte, während bei LK17 und LK31 diese nach 48 Stunden gemessen wurden. Generell war ein Anstieg der Oberflächenexpression nach vier Stunden kaum messbar und erst nach 24 Stunden war ein klarer Trend zu erkennen (Abb. 6).





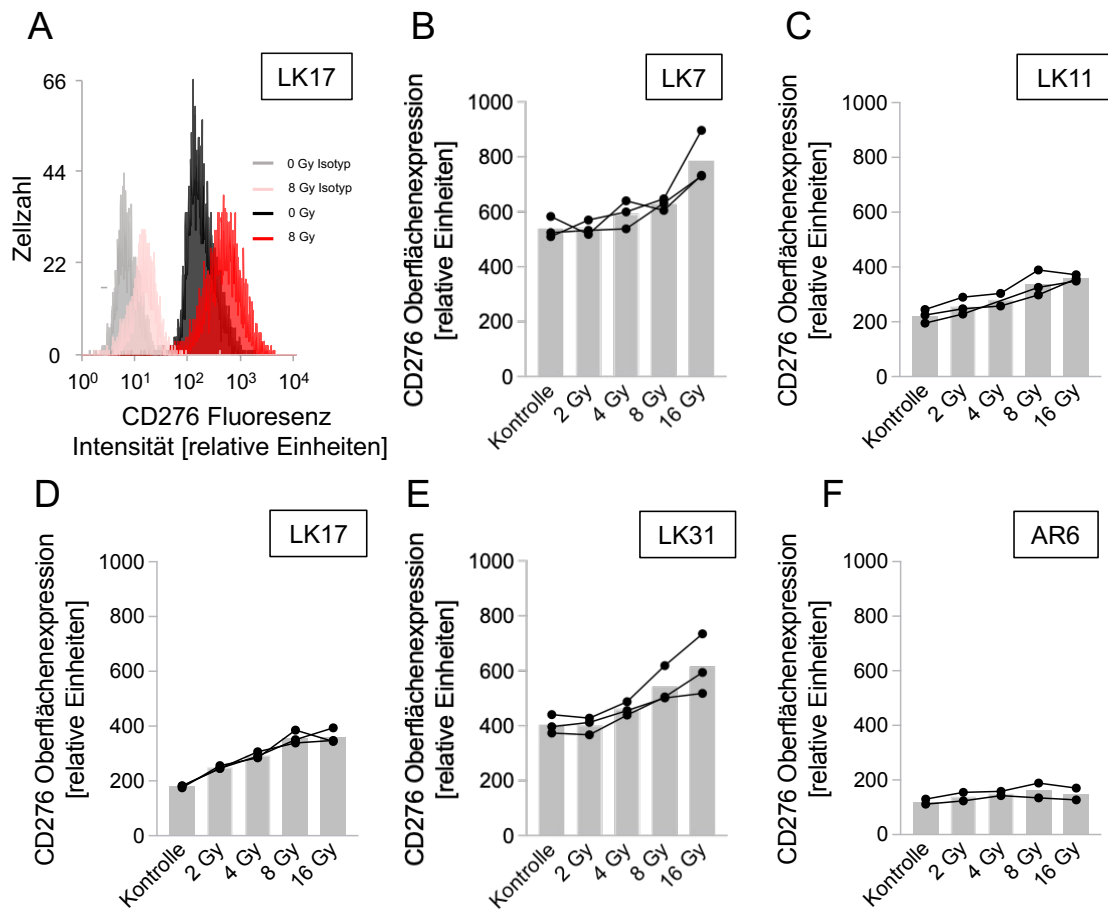
### Abbildung 6: Bestrahlungskinetik Oberflächenexpression

Strahleninduzierte Hochregulation der CD276 Oberflächenexpression in pGSZ-Kulturen (A) Repräsentative Histogramme zeigen die spezifische Fluoreszenz des anti-CD276 Antikörpers und der Isotypkontrolle für LK11 (B, C, D, E, F). Dosisabhängige Änderung der spezifischen CD276 Oberflächenexpression von LK7, LK11, LK17, LK31 und AR6. Die Oberflächenexpression wurde 0 bis 72 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy in der Durchflusszytometrie ermittelt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der einzelnen Experimente.

#### 6.4.2 Bestrahlungsdosis

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die CD276-Oberflächenexpression betrachtet. Hierfür wurden zunächst verschiedene Bestrahlungsdosen (0-16 Gy) appliziert, und die CD276 Oberflächenexpression nach 48 h bestimmt (Abb. 7).

Auch hier zeigten die Ausgangswerte eine ähnliche Verteilung wie in Abbildung 2. Bei den mesenchymalen pGSZ-Kulturen LK7 und LK31 wurden deutlich höhere CD276-Expressionswerte gemessen als bei den proneuralen LK11 und AR6. In allen pGSZ-Kulturen wurde ein signifikanter Anstieg der Expressionswerte festgestellt, außer für AR6 (Kruskal-Wallis: AR6:  $p = 0.4628$ ; LK7:  $p = 0.0221$ ; LK11:  $p = 0.02845$ ; LK31:  $p = 0.0176$ ; LK17:  $p = 0.009074$ ). Der Anstieg unterschied sich zwischen den einzelnen pGSZ-Kulturen deutlich. Während für AR6 ein geringer Anstieg von ungefähr 30 % nach 8 Gy feststellbar war, verdoppelten sich die Expressionswerte bei LK17. Die Expressionswerte für LK7 stiegen um bis zu 45 %, für LK31 um bis zu 52 % und für LK11 bis zu 60 % im Vergleich zum Startwert. Die höchsten Oberflächen-Expressionswerte wurden für LK17 und AR6 nach 8 Gy festgestellt. LK7, LK11 und LK31 zeigten nach 16 Gy die höchsten Werte.



### Abbildung 7: Bestrahlungsdosis Oberflächenexpression

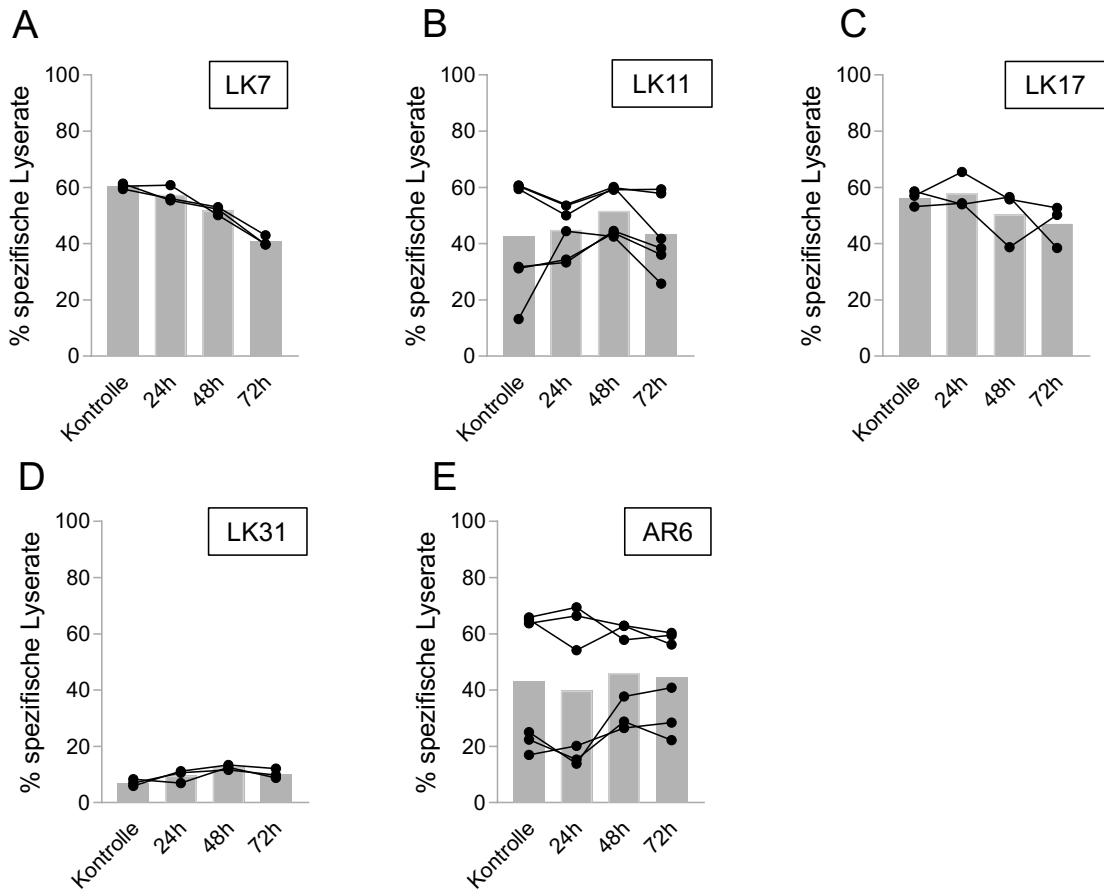
Strahleninduzierte Hochregulation der CD276 Oberflächenexpression in pGSZ-Kulturen  
**(A)** Repräsentative Histogramme zeigen die spezifische Fluoreszenz des anti-CD276 Antikörpers und der Isotypkontrolle für LK17 mit Bestrahlung (0 oder 8 Gy). **(B, C, D, E, F)** Zeitabhängige Änderung der spezifischen CD276 Oberflächenexpression von LK7, LK11, LK17, LK31 und AR6. Die Oberflächenexpression wurde 48 Stunden nach Bestrahlung mit 0-16 Gy mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der einzelnen Experimente.

## 6.5 Bestrahlungseffekte im Zytotoxizitäts-Assay

Um mögliche Bestrahlungseffekte auf die zytotoxische Wirksamkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen gegen die pGSZ-Kulturen zu untersuchen, wurden Calcein Release Assays 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung der Tumorzellen mit 8 Gy durchgeführt. Das Verhältnis Tumorzelle zu CD276 CAR-NK-Zelle betrug 2,5:1 und 0,5:1 (Abb. 8 und Abb. 9).

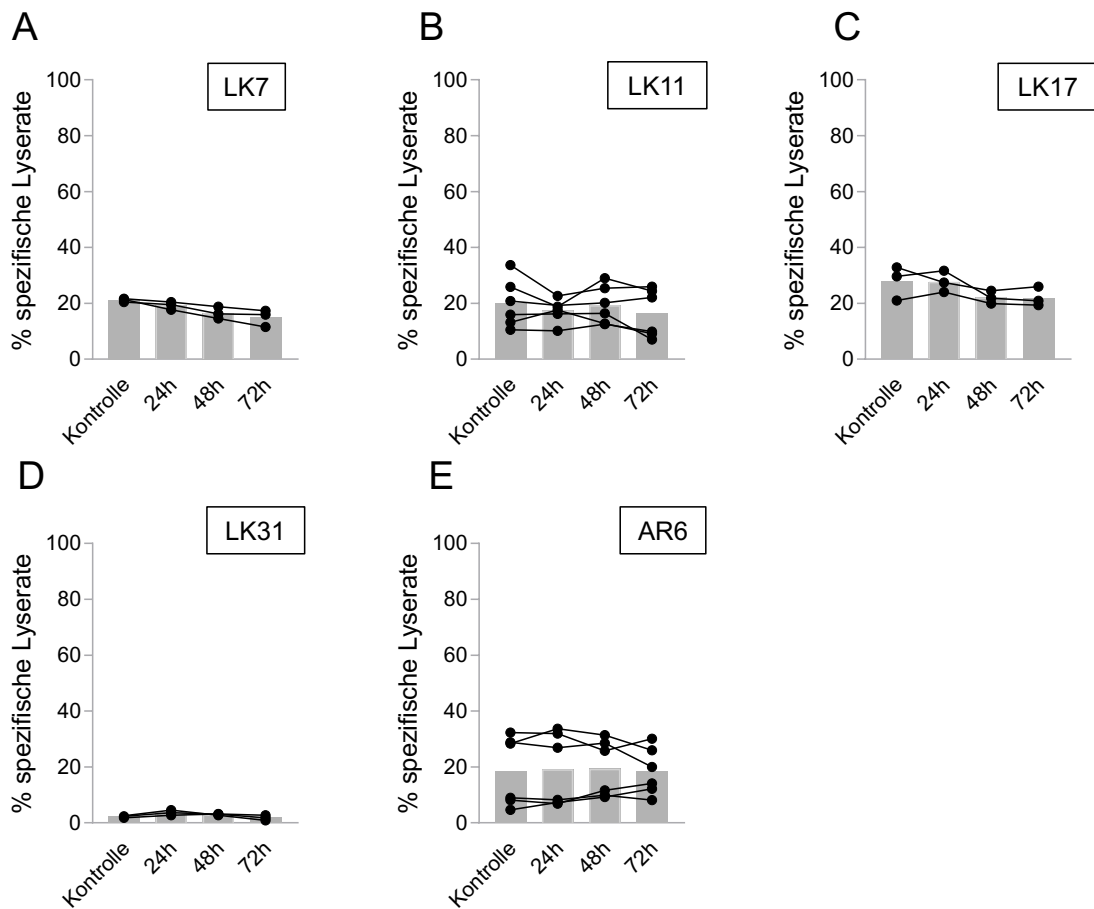
Im Unterschied zu den Vorwerten (s. Abb. 4) unterschieden sich die Startwerte der Lyseraten zum Teil stark untereinander. Dabei zeigten LK7 und LK17 sehr hohe Lyseraten mit ca. 60 % und 56 % für das 2,5:1 E:Z-Ratio und ca. 21 % und 28 % für das 0,5:1 E:Z-Ratio. LK11 und AR6 zeigten moderate bis hohe Lyserate mit jeweils 43% für das 2,5:1 Ratio. Für das 0,5:1 E:Z-Ratio zeigten sie ca. 20 % und 19 %. Dabei bestanden besonders bei AR6 große Unterschiede zwischen den einzelnen Datenpunkten. LK31 zeigte die geringsten Lyseraten mit 7 % für die 2,5:1 Ratio und 2 % für das 0,5:1 E:Z-Ratio.

Für das E:Z-Ratio 2,5:1 konnte nur bei LK7 eine signifikante Veränderung der Lyseraten nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis für 2,5:1 Ratio: LK11:  $p = 0,56$ ; LK17:  $p = 0,154$ ; LK31:  $p = 0,3775$  und AR6:  $p = 0,9402$ ; LK7:  $p = 0,02162$ ). Für LK31 und LK7 konnte zudem für das 0,5:1 E:Z-Ratio eine signifikante Änderung festgestellt werden (Kruskal-Wallis für 0,5:1 Ratio: LK11:  $p = 0,8415$ ; LK17:  $p = 0,2228$ ; LK31:  $p = 0,03781$  und AR6:  $p = 0,9885$ ; LK7:  $p = 0,03069$ ). Die spezifischen Lyseraten sanken mit steigender Zeit zwischen Bestrahlung und Calcein Release-Assay bei LK7 und LK17 für beide Ratio. Die geringsten Werte wurden jeweils für beide Ratio nach 72 Stunden gemessen. Die relative Minderung betrug dabei für LK7 bis zu 32 % für die 2,5:1 E:Z-Ratio und 30% für 0,5:1 E:Z-Ratio. Für LK17 wurde eine Minderung bis zu 16 % für die 2,5:1 E:Z-Ratio und 21 % für 0,5:1 festgestellt. Für LK31 und AR6 kam es zu keiner bedeutsamen Veränderung der Lyseraten bei beiden E:Z-Ratio. Für LK11 wurden ähnliche Lyseraten zu den unbestrahlten Kontrollzellen festgestellt, wobei ein geringer nicht signifikanter Anstieg nach 48 Stunden um 21 % verzeichnet wurde für das 2,5:1 E:Z-Ratio, jedoch nicht für das 0,5:1 E:Z-Ratio .



**Abbildung 8: Bestrahlungseffekt CAR NK-Aktivität (2,5:1 E:Z-Ratio)**

Zeitliche Änderung der Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen (2,5:1 E:Z-Ratio) nach Inkubation mit bestrahlten pGSZ-Kulturen. **(A, B, C, D, E)** Die spezifische Lyserate der CD276-CAR NK-92 Zellen wurde zwei Stunden nach Inkubation mit den pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31, und AR6 bestimmt. Die Tumorzellen wurden 24, 48 oder 72 Stunden zuvor mit 8 Gy bestrahlt. Das E:Z-Ratio betrug 2,5:1. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis sechs experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der einzelnen Experimente.



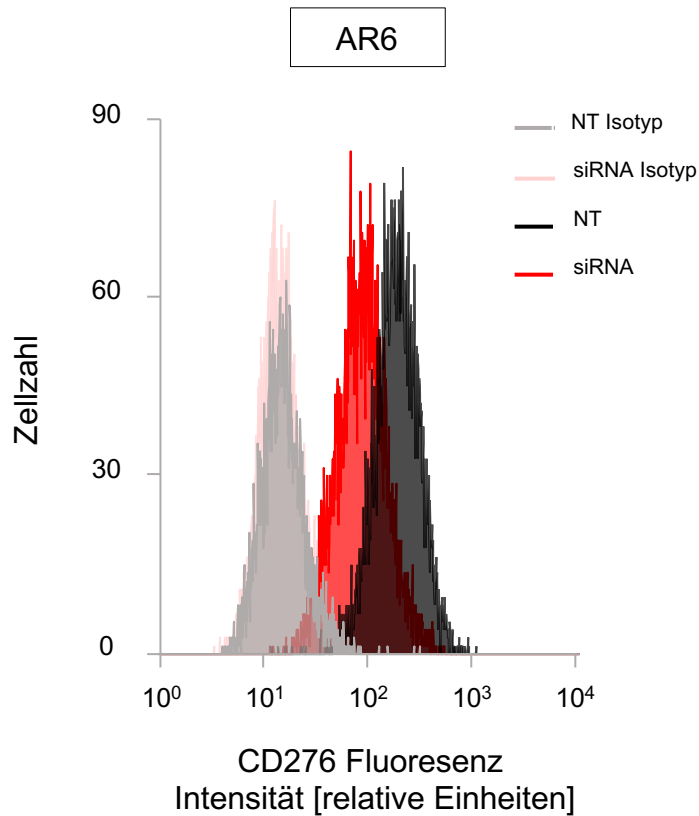
**Abbildung 9: Bestrahlungseffekte CAR NK-Aktivität (0,5:1 E:Z-Ratio)**

Zeitliche Änderung der Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen (2,5:1 Ratio) nach Inkubation mit bestrahlten pGSZ-Kulturen (0,5:1 Ratio) (A, B, C, D, E). Die spezifische Lyserate der CD276-CAR NK-92 Zellen wurde zwei Stunden nach Inkubation mit den pGSZ-Kulturen LK7, LK11, LK17, LK31, und AR6 bestimmt. Die Tumorzellen wurden 24, 48 oder 72 Stunden zuvor mit 8 Gy bestrahlt. Das E:Z-Ratio betrug 2,5:1. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis sechs experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der einzelnen Experimente.

## 6.6 CD276 Knockdown

Da in den bisher durchgeführten Experimenten keine Abhängigkeit der spezifischen Lyserate von der Oberflächenexpression festgestellt werden konnte, wurde im letzten Schritt der Arbeit die Expression von CD276 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert. Hierfür wurden AR6, LK11 und LK31 mit siRNA-Oligonukleotiden behandelt, welche entweder spezifisch für CD276 (anti-CD276) oder ungerichtet (NT) waren. Nach 72h wurden dann die behandelten Zellen auf ihre CD276-Oberflächenexpression im FACS sowie die spezifische Lyserate der CD276-CAR NK-92 Zellen gegen die behandelten Tumorzellen im Calcein Release Assay untersucht (Abb. 10 u. 11).

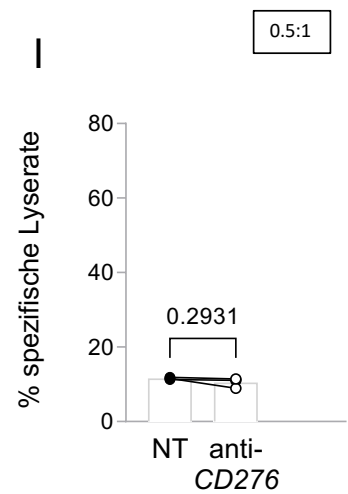
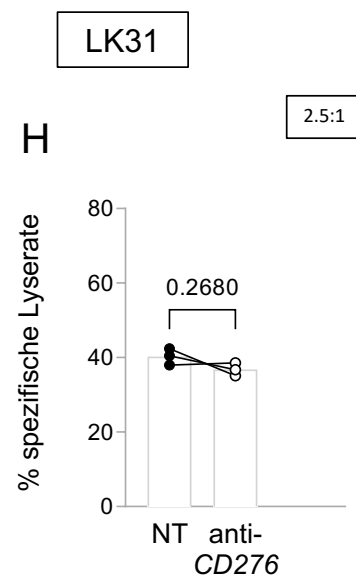
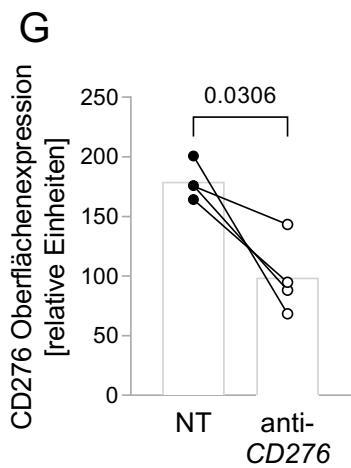
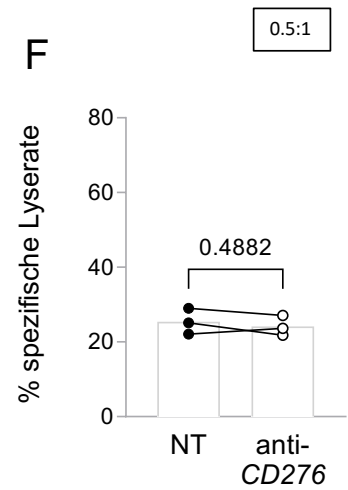
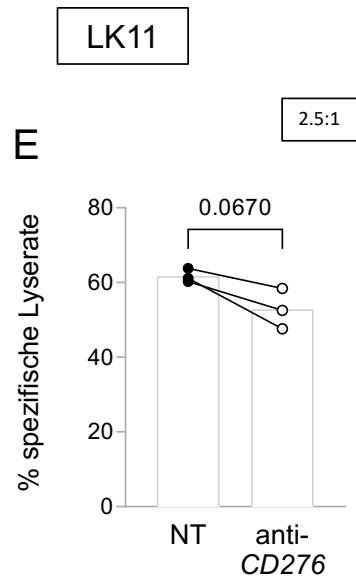
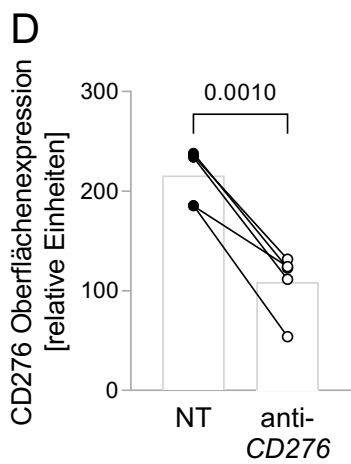
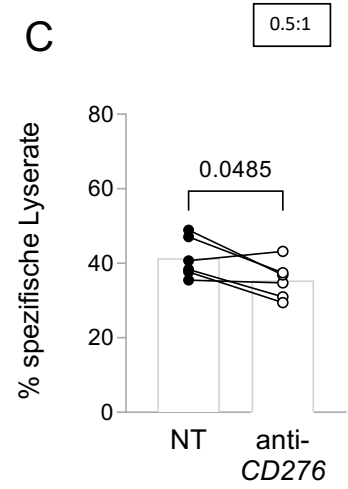
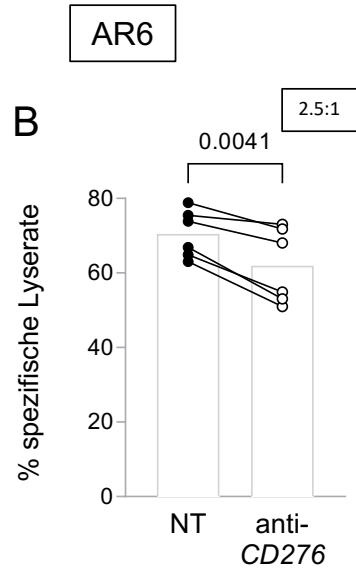
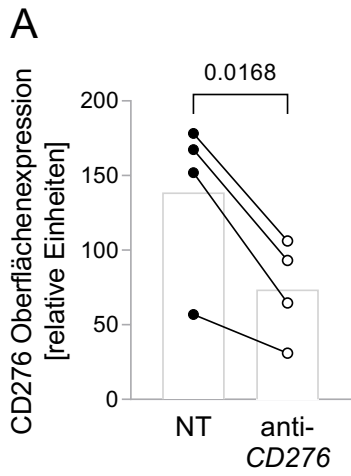
In allen Zellkulturen konnte eine signifikante Verringerung der CD276-Oberflächenexpression gezeigt werden (Abb. 10 und 11). Für AR6 wurde eine signifikante Minderung der spezifischen Lyserate für beide untersuchten E:Z-Ratio's festgestellt (Abb. 11, B u. C). Für LK11 konnte eine numerische Reduktion der Lyserate für die 2,5:1 E:Z-Ratio gemessen werden. Bei der 0,5:1 E:Z-Ratio wurden die Tumorzellen jedoch annähernd unverändert lysiert (Abb. 11, E u. F). Für LK31 wurde nahezu keine Veränderung der Lyseraten festgestellt (Abb. 11, H u. I). Große Verringerungen der Oberflächenexpression führten lediglich zu kleinen Verringerungen der Lyseraten. So entsprach beispielsweise die relative Senkung der CD276 Oberflächenexpression bei AR6 von 47 %, einer Senkung der spezifischen Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen um 12 % für das 2,5:1 E:Z-Ratio.



**Abbildung 10: Histogramm - siRNA vermittelter CD276 Knockdown**

siRNA bedingte Herunterregulierung der CD276 Oberflächenexpression in pGSZ-Kulturen (am Beispiel AR6). Repräsentative Histogramme zeigen die spezifische Fluoreszenz des anti-CD276 Antikörpers und der Isotypkontrolle für AR6 nach CD276-siRNA oder non-targeting siRNA Transfektion.





### **Abbildung 11: siRNA vermittelter Knockdown von CD276**

Abnahme der spezifischen Lyserate durch siRNA vermittelte Herunterregulierung der CD276 Oberflächenexpression (**A, D, G**) Spezifische CD276 Oberflächenexpression von AR6, LK11 und LK31 72 Stunden nach Behandlung mit NT-siRNA (NT) und anti-CD276-siRNA (anti-CD276) (**B, C, E, F, H, I**). Spezifische Lyserate der CD276-CAR NK-92 Zellen für AR6, LK11 und LK31 72 Stunden nach Behandlung mit NT-siRNA (NT) oder anti-CD276-siRNA (anti-CD276). Das E:Z-Ratio betrug 2,5:1 oder 0,5:1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis sechs experimentellen Replikaten sowie die verbundenen Einzelwerte der behandelten Replikate.

## 7. Diskussion

### 7.1 CD276 im Glioblastom

Tumorstammzellen spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Therapieresistenzen und Rezidiven (Chen et al., 2012). Im Glioblastom unterschieden sich Stammzellsubtypen voneinander im Hinblick auf das Wachstumsmuster und Langzeitüberleben der zugehörigen Patienten. Besonders mesenchymale Subgruppen wiesen in früheren Arbeiten eine schlechte Prognose und aggressives Wachstumsmuster auf (Ganser et al., 2022).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die mesenchymale pGSZ-Kulturen besonders hohe CD276 Oberflächenexpression konstant über mehrere Passagen aufweisen im Vergleich zu proneuralen pGSZ-Kulturen (Abb.3, D-F, I). Dass eine Hochexpression von CD276 zu einem invasiveren Wachstum führt, wurde bereits in anderen in vitro Arbeiten an Melanomen, Prostata- und Brustkrebszelle gezeigt (Chen et al., 2008; Yuan et al., 2011). Auch bei Ösophaguskarzinomen war eine erhöhte CD276 Expression im Tumor mit einem verminderten Patientenüberleben und vermehrtem invasivem Wachstum verbunden (Chen et al., 2015).

Darüber hinaus wurden verschiedene Signalwege identifiziert, worüber CD276 eine protumorigene Wirkung entfalten könnte. So wurde beispielsweise an kolorektalen Karzinomzellen gezeigt, dass CD276 über den JAK2/STAT3/MMP9 Signalweges das invasive Wachstum des Tumors fördert (Liu et al., 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass CD276 die Chemoresistenz bei Brustkrebszelllinien gegenüber Paclitaxel erhöhte. Die vermehrte Aktivierung des JAK/STAT3/Survivin Signalweg, wie auch die Aufhebung des G<sub>2</sub>-M-Phase Arrests wurden u.a. dafür verantwortlich gemacht (Liu et al., 2011; Ma et al., 2020).

## **7.2 CD276 Regulationsmechanismen im Glioblastom**

Das Glioblastom zeichnet sich durch eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität aus. Um dieser gerecht zu werden, wurden mesenchymale und proneurale pGSZ-Kulturen auf ihre CD276 Oberflächenexpression untersucht. Obwohl eine unterschiedliche Oberflächenexpression von CD276 zwischen den molekularen Subtypen in der Arbeit gezeigt werden konnte, unterschieden sich mRNA-Abundanzen zwischen den Subgruppen, mit Ausnahme von LK31, nicht (Abb. 3., A). Die größere Abweichung der mittleren Abundanz bei LK31 lässt sich dabei durch die geringe Anzahl der Datenpunkte erklären.

Die fehlende Korrelation zwischen CD276-Oberflächenexpression und CD276-mRNA-Abundanz wurde bereits in vorherigen Untersuchungen festgestellt. Es wurden posttranskriptionale und posttranslationale Regulationsmechanismen als Ursachen diskutiert (Getu et al., 2023). So wurden bereits in Neuroblastomen, Cervixkarzinomen, Osteosarkomen, kolorektalen Tumoren sowie Medulloblastomen die posttranskriptionelle Regulation von CD276 durch verschiedene miRNA nachgewiesen (Kanchan et al., 2020; L. Wang et al., 2016; Z. S. Wang et al., 2016; Xu et al., 2009; Yang et al., 2020). Zudem wurden weitere Einflussfaktoren identifiziert, wie das ILT-4 (Zhang et al., 2015). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an Patienten mit Triple Negativen Brustkrebs, dass CD276 auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden (Y. Huang et al., 2021). Zuletzt wurden noch weitere Mechanismen beschrieben, wie z.B. die Glykosylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung des CD276 Proteins, welche die unterschiedliche Oberflächenexpression bei gleicher mRNA Abundanz erklären könnte (Getu et al., 2023; Y. Huang et al., 2021).

## **7.3 Vielversprechende Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen**

Immunzelltherapien befinden sich im Fokus der aktuellen Forschung, wobei erste Therapien bereits eine Zulassung zur Therapie von Leukämien bzw. Lymphomen erhielten (Abramson et al., 2020; Maude et al., 2018). Ferner wurden auch erste Erfolge bei soliden Tumoren festgestellt (Del Bufalo et al., 2023). CAR

exprimierenden NK-92 Zellen werden derzeit in ersten Studien an Patienten mit Glioblastom eingesetzt (Burger et al., 2023). Eine erfolgreiche Immunzelltherapie zur Behandlung des Glioblastoms wurde jedoch noch nicht routinemäßig klinisch etabliert.

Um die Aktivität der CAR NK-Zellen gegenüber pGSZ-Kulturen mit unterschiedlichen Zielantigen-Dichten vergleichen zu können, wurde zunächst das E:Z-Ratio für die weiteren Zytotoxizitätsversuche definiert (Abb. 4). Hierbei wurde eine maximale Lyse bei einem E:Z-Ratio von 2,5:1 festgestellt, eine weitere Erhöhung der E:Z-Ratio auf 5:1 führte zu einer leichten Verminderung der Lyserate (Abb. 4, C). Deswegen wurde ein E:Z-Ratio von 2,5:1 für alle weiteren Versuche als höheres Ratio verwendet. Um biologisch noch besser von technischen Effekten unterscheiden zu können, wurde bei allen Experimenten zusätzlich eine E:Z-Ratio von 0,5:1 untersucht. Für alle E:Z-Ratio wurde im Gegensatz zu den CD276-CAR NK-92 Zellen keine zytotoxische Aktivität der parenteralen NK-92 Zellen nachgewiesen (Abb. 4, C).

Da mesenchymale pGSZ-Kulturen deutlich höhere CD276 Oberflächenexpressionswerte aufwiesen, wurde vermutet, dass hierdurch eine vermehrte Lyse der Tumorzellen erfolgt. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Die CD276-CAR NK-92 Zellen zeigten bei der in vitro Inkubation mit den pGSZ-Kulturen bei allen Kulturen hohe Lyseraten, unabhängig ihrer CD276 Oberflächenexpression. So führte die etwa fünffach höheren CD276 Oberflächenexpression von LK7 im Vergleich zu AR6 zu keinerlei Unterschied der Lyseraten für beide untersuchten E:Z-Ratio (Abb. 3, E; Abb. 4. D-E). Die Arbeit bestätigt damit das ausgeprägte zytotoxische Potential der CD276-CAR NK-92 gegen CD276 exprimierende Tumorzellen, wie u.a. bereits am Neuroblastom und am malignen Melanom gezeigt wurde. (Stefan Grote et al., 2021; S. Grote, G. Ureña-Bailén, et al., 2021).

Weitere Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe ergaben übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf die Zytokinfreisetzung. Es wurde kein Unterschied der Zytokinfreisetzung nach Co-Inkubation mit den pGSZ-Kulturen mit

unterschiedlicher CD276 Expression festgestellt (Stransky et al., 2024, Mansukript eingereicht).

#### **7.4 Bestrahlungseffekte auf CD276 mRNA-Abundanz und Oberflächenexpression**

Es wurde keine Steigerung der CD276-mRNA in pGSZ-Kulturen nach Bestrahlung nachgewiesen, jedoch eine Hochregulation der CD276 Oberflächenexpression (Abb. 6 und 7). Zudem wurde beobachtet, dass die Oberflächenexpression mit steigender Bestrahlungsintensität (ab 4 bis 8 Gy) und steigendem Abstand (bis 72 h) zwischen Bestrahlung und Messung zunahm (Abb. 6, E und Abb. 7, E).

Da bei einer fraktionierten Bestrahlung meist 2 Gy appliziert werden, bleibt fraglich, ob die Bestrahlung zu einer Hochregulierung der CD276 Oberflächenexpression bei Patienten mit Glioblastom im klinischen Setting führt. In diesem Kontext erscheint die konkomitante Gabe einer CD276 gerichteten Immuntherapie während der fraktionierten Bestrahlungstherapie des Glioblastoms plausibel.

Ob die Hochregulation von CD276 als Immuncheckpoint zur immunsuppressiven Wirkung einer Bestrahlungstherapie beiträgt, stellt eine interessante neue Fragestellung dar. In der Literatur wurde beschrieben, dass die T-Zell-Proliferation und Aktivierung in Tumoren durch CD276 gehemmt wird (Lee et al., 2017). Daneben wurde gezeigt, dass CD276 bei Neuroblastomen eine Rolle bei der NK-Zell-Hemmung spielt (Castriconi et al., 2004). Außerdem wurde festgestellt, dass CD276 eine verminderte Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  unterstützt (Suh et al., 2003). Eine bestrahlungsinduzierte CD276 Hochregulation könnte demzufolge die immunhemmenden Effekte verstärken.

## **7.5 Bestrahlungsbedingte Modulierung der CD276-CAR NK-92 Zellen Aktivität**

Da die Bestrahlung der Tumorzellen zu einer Hochregulation der CD276 Oberflächenexpression führte, war unsere initiale Hypothese, dass eine höhere Oberflächenexpression zu einer verbesserten Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen führt.

Im Gegensatz zu dieser Überlegung, führte die Bestrahlung der Zielzellen nicht zu einer einheitlichen Erhöhung der Lyseraten durch CD276-CAR NK-92 Zellen. Ein Sättigungseffekt der Lyseraten ist unwahrscheinlich, da für beide Ratio` ähnliche Ergebnisse festgestellt wurden. Die auffallend stark variierende Lysewerte bei LK31 und mit AR6 im Vergleich zu vorherigen Experimenten könnten sich durch Fehler bei der Zellzählung oder zu geringer Nährstoffversorgung der CAR NK-Zellen erklären lassen (Abb. 8 und 9). Eine begleitende Bestrahlung zur Immunzelltherapie mit CD276-CAR NK-92 Zellen hätte nach diesen Ergebnissen wahrscheinlich keine Verbesserung des Therapieansprechens zur Folge.

Es ist zu beachten, dass die Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen eine geringe Abhängigkeit von der CD276-Oberflächenexpression aufwies. Zum einen könnten andere CD276 gerichteten Therapien, welche eine höhere CD276 Abhängigkeit zeigen, dennoch von dieser Hochregulation profitieren. Zum anderen könnten auch andere NK-Zellklone, welche eine andere Zusammensetzung von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren besitzen, zu einer größeren Antigenabhängigkeit führen (Stransky et al., 2024, Manuskript eingereicht). Eine spannende weiterführende Frage ist, ob die antigenabhängige Aktivität eher vom NK-Zellklon oder vom Zielantigen selbst abhängt.

## **7.6 Antigenabhängigkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen**

Um die Abhängigkeit der CAR NK-Zell Zytotoxizität von der Antigenichte weiter zu untersuchen, wurde im letzten Teil der Arbeit siRNA Knockdowns durchgeführt (Abb. 10 und 11).

Für alle untersuchten pGSZ-Kulturen konnte eine zum Teil deutliche siRNA-bedingte Herunterregulation der CD276 Oberflächenexpression gezeigt werden. Gleichzeitig verminderte sich die Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen jedoch nur geringfügig (Abb. 11).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bereits ein geringes Expressionsniveau von CD276 zu einer hohen Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen führt. Die geringe Aktivierungsschwelle der Effektorzellen könnte zu einer effizienten Lyse der Tumorzellen führen, selbst wenn diese die Oberflächenexpression herunterregulieren würden. Es könnten jedoch vermehrte On-Target/Off-Tumor Toxizitäten auftreten, da auch normale Zellen CD276 exprimieren.

Ob auch normale Zellen mit einer geringen CD276 Oberflächenexpression zu einer Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen führt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In weiterführender Arbeit meiner Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen bei nicht-Tumorzelllinien deutlich geringer ist, obwohl deren CD276 Oberflächenexpression mit den der pGSZ-Kulturen vergleichbar war (Stransky et al., 2024, Manuskript eingereicht). Dieser Effekt wurde auf die intrinsische Regulierung von NK-Zellen zurückgeführt, welche in der Lage sind zwischen normalen und Tumorzellen zu unterscheiden. Dabei sind Tumorzellen in der Lage sich durch HLA-I Verlust der T-Zellantwort zu entziehen. NK-Zellen dagegen steigern durch den HLA-I Verlust auf den Tumorzellen ihre Aktivität (Vivier et al., 2011).

An den verwendeten CD276-CAR NK-92 Zellen konnten weiterführende Studien meiner Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen der HLA-I-Expression auf Zielzellen und deren zytotoxischen Aktivität nachgewiesen werden. Dabei führten hohe HLA-I Werte zu einer geringeren Lyseaktivität, was vermutlich auf die Expression von inhibitorischen Rezeptoren, wie der NKG2A auf den CD276-CAR NK-92 Zellen, zurückzuführen ist (Stransky et al., 2024, Manuskript eingereicht). Ähnliche Effekte wurden zudem bei in vitro Versuchen mit anderen CAR NK-Zellen beschrieben, welche NK-Zellen aus anderer Herkunft nutzten (Portillo et al., 2021; Tang et al., 2021). Das Risiko einer On-Target/Off-Tumor Toxizität



würde hierdurch vermutlich verringert (Stransky et al., 2024, Manuskript eingereicht).

## **7.7 Ungeklärte Herausforderungen der CD276-CAR NK Therapie**

Für die klinische Anwendung bleiben mehrere Fragen offen. Erstens ist zu klären, ob das geprüfte Effektor-Zielzellen-Verhältnis realisierbar ist. Hierfür müssten verschiedene Applikationsvarianten geprüft werden, welche eine hohe Zellzahl im Glioblastom ermöglichen. Im Rahmen einer intravenösen Gabe ist davon auszugehen, dass die NK-Zellen die Blut-Hirn-Schranke bei einer Neuroinflammation überwinden können (Ning et al., 2023). Es ist jedoch ungeklärt, ob CAR NK-Zellen in ausreichender Menge an ihren Wirkort gelangen würden. Eine vielversprechendere Applikationsform ist die direkte Injektion der Effektorzellen ins Gehirn. So könnte bei der Injektion von HER2-spezifischen CAR NK-Zellen hohe Dosen von Zellen appliziert werden, ohne dass dosislimitierende Toxizitäten oder gravierenden Nebenwirkungen (z.B. dem CRS) auftraten (Burger et al., 2023).

Zweitens ist unklar, wie weit CD276-CAR NK-Zellen das Glioblastom infiltrieren können. Wie bereits erwähnt, vermindert u.a. das TME des Glioblastoms die Einwanderung von antitumorösen Immuneffektorzellen (Iglesia et al., 2016). Hierdurch könnte die Effektivität CD276-CAR NK-Zellen vermindert werden. Eine interessante weiterführende Frage in diesem Kontext wäre, ob eine Bestrahlung die Invasivität der CD276-CAR NK-92 Zellen positiv beeinflussen könnte.

Zuletzt ist zu beachten, dass Tumorzellen über den Verlust bzw. die Herunterregulation vom Zielantigen in der Lage sind, Resistenzen gegen immunzellulären Therapien zu bilden (Majzner & Mackall, 2018). Ob Tumorzellen auch CD276 gezielt herunterregulieren können, um einer möglichen CD276-CAR NK-92 Zelltherapie zu entgehen, ist bisher nicht geklärt.

## 7.8 Limitation

Diese Arbeit besitzt mehrere Limitationen. Erstens wurden CD276-CAR NK-92 Zellen nicht vorbestrahlt, obwohl dies in der klinischen Anwendung üblich ist. Aus den bereits erwähnten Vorarbeiten geht jedoch hervor, dass die Zellen sowohl nach Bestrahlung als auch in azidotischer, hypoxischer und Immunsuppressiver Umgebung ihre Funktion behalten (Stefan Grote et al., 2021).

Zweitens wurden in den Experimenten keine nicht-Tumorzelllinien untersucht, um diese mit den Tumorzelllinien zu vergleichen. In der weiterführenden Arbeit meiner Arbeitsgruppe wurde dies zwar aufgearbeitet, jedoch stellen dort die verwendeten Zelllinien eventuell keine ideale Repräsentation von nicht-Tumorzelllinien dar (Stransky et al., 2024, Manuskript eingereicht).

Drittens konnte der Mechanismus für die geringe Antigenabhängigkeit der CD276-CAR NK-92 Zellen nicht aufgedeckt werden.

Abschließend ist zu betonen, dass ausschließlich in-vitro Versuche durchgeführt wurden, so dass keine abschließende Aussage über mögliche klinische Effekte durch die beschriebene Bestrahlungseffekte möglich ist.

## 7.9 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen pGSZ-Kulturen sich in ihrer CD276 Oberflächenexpression unterschieden (Abb. 3). Eine Korrelation zwischen den mRNA-Abundanz und der Oberflächenexpression bestand nicht (Abb. 3), was eine posttranskriptionale Regulation der CD276-Oberflächenexpression wahrscheinlich macht. Die CD276 Oberflächenexpression konnte in den meisten pGSZ-Kulturen durch Bestrahlung erhöht werden (Abb. 6 und 7), was im ungünstigsten Fall die Immunevasion der Glioblastomzellen fördern könnte.

Die Therapie mit CD276-CAR NK-92 Zellen erscheint vielversprechend. Bei der Inkubation mit den pGSZ-Kulturen wurden hohe Lyseraten festgestellt, unabhängig des individuellen CD276 Expressionsniveaus (Abb. 4). Auch konnten

durch die siRNA vermittelte Herunterregulation der CD276 Oberflächenexpression die Lyseraten nicht vermindert werden (Abb. 11). Vermutlich besteht somit nur eine geringe Abhängigkeit der Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen von der Antigendichte von CD276. Die geringe Aktivierungsschwelle der CAR NK-92 Zellen könnte dabei zu vermehrter On-Target/Off-Tumor Toxizität führen, da auch nicht-Tumorzellen CD276 exprimieren.

Weiterführende Arbeiten in meiner Arbeitsgruppe (Stransky et al, 2024, Manuskript eingereicht) zeigten indes, dass die erhöhte HLA-I Expression auf normalen Zelllinien die zytotoxische Aktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen verringert. Eine On-Target/Off-Tumor Toxizität könnte hierdurch verringert werden. Beim Glioblastom könnte somit eine CD276-CAR NK-Zell Therapie außerhalb der fraktionierten Strahlentherapie eine mögliche, neue Therapiestrategie darstellen. Hierbei wären noch die Route der Applikation der CD276-CAR NK-92 Zellen ins Gehirn und deren Invasionsfähigkeit ins Glioblastom zu klären bzw. zu analysieren.

Darüber hinaus könnten anderen CD276-basierte Immunzelltherapien, die eine stärkere Abhängigkeit von der Target-Antigen-Expression zeigen, in einem konkomitanten Setting von einer strahlungsinduzierten Hochregulation der CD276 Oberflächenexpression profitieren.

## 8. Zusammenfassung

**Einführung:** Der häufigste primäre Hirntumor bei Erwachsenen ist das Glioblastom, welches durch ein aggressives Wachstum und eine schlechte Prognose gekennzeichnet ist. Zelluläre Immuntherapien haben in jüngster Vergangenheit große Erfolge bei der Behandlung von hämatologischen Tumoren erzielt. Jedoch blieb ein erfolgreicher Einsatz bei soliden Tumoren, wie dem Glioblastom, bisher hinter den Erwartungen zurück. In diesem Kontext konnte eine vermehrte Expression von CD276, ein Immuncheckpoint, in Glioblastomzellen nachgewiesen werden. Für zelluläre Immuntherapien, wie der CAR NK-92 Zelltherapie, stellt dieses Protein ein vielversprechendes Zielantigen dar. Diese Arbeit soll die Abhängigkeit der CD276-CAR NK-Zelltherapie vom Zielantigen betrachten und mögliche Effekte einer vorab Bestrahlung der Zielzellen auf diese Therapie untersuchen.

**Methoden:** Es wurden mesenchymale und proneurale pGSZ-Kulturen auf ihre CD276-mRNA Abundanz und CD276 Oberflächenexpression hin untersucht. Zusätzlich wurden die Tumorzellen mit CD276-CAR NK-92 Zellen inkubiert und deren Lysierungsgrad mittels Calcein Release Assay bestimmt. Die pGSZ-Kulturen wurden nach verschiedenen Bestrahlungsprotokollen behandelt und die genannten Parameter erhoben. Abschließend wurde mittels siRNA die CD276 Oberflächenexpression der pGSZ-Kulturen herunterreguliert und die Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 bestimmt.

**Ergebnisse:** Während die *CD276-mRNA* Abundanz keine Veränderung nach Bestrahlung aufwies, konnte die CD276 Oberflächenexpression in allen Zelllinien gesteigert werden. Zudem zeigten die CD276-CAR NK-92 Zellen bei allen pGSZ-Kulturen hohe Lyseaktivität, welche jedoch nicht durch eine Vorabbestrahlung der Tumorzellen gesteigert werden konnte. Darüber hinaus führte eine deutliche Herunterregulierung der CD276 Oberflächenexpression auf den pGSZ-Kulturen nur zu geringen Verlust der Lyseaktivität der CD276-CAR NK-92 Zellen. Die auftretenden Effekte unterschieden sich kaum zwischen den molekularen Subgruppen.

**Fazit:** Es konnte eine ausgeprägte zytotoxische Wirksamkeit von CD276-CAR NK-92 Zellen gegen alle Primärkulturen von mesenchymalen und proneuralen Glioblastomstammzellen gezeigt werden, unabhängig vom CD276-Expressionslevel. Zudem legen die gezeigten Daten nahe, dass eine Vorabbestrahlung der Tumorzellen die zelluläre Immuntherapie mit CD276-CAR NK-92 wahrscheinlich nicht verstärken würde, trotz Hochregulation der CD276-Oberflächenexpression. Andere CD276 spezifische Immuntherapien könnten bei größere Antigenabhängigkeit jedoch von der Hochregulation profitieren.

## 9. Literaturverzeichnis

- Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., . . . Siddiqi, T. (2020). Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 396(10254), 839-852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0)
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J., & Klingemann, H. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*, 10(6), 625-632. <https://doi.org/10.1080/14653240802301872>
- Barker, H. E., Paget, J. T., Khan, A. A., & Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*, 15(7), 409-425. <https://doi.org/10.1038/nrc3958>
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat Med*, 23(10), 1124-1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Benencia, F., Muccioli, M., & Alnaeeli, M. (2014). Perspectives on reprogramming cancer-associated dendritic cells for anti-tumor therapies. *Front Oncol*, 4, 72. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00072>
- Brustmann, H., Igaz, M., Eder, C., & Brunner, A. (2015). Epithelial and tumor-associated endothelial expression of B7-H3 in cervical carcinoma: relation with CD8+ intraepithelial lymphocytes, FIGO stage, and phosphohistone H3 (PHH3) reactivity. *Int J Gynecol Pathol*, 34(2), 187-195. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000116>
- Burger, M. C., Forster, M. T., Romanski, A., Strassheimer, F., Macas, J., Zeiner, P. S., Steidl, E., Herkt, S., Weber, K. J., Schupp, J., Lun, J. H., Strecker, M. I., Wlotzka, K., Cakmak, P., Opitz, C., George, R., Mildenerger, I. C., Nowakowska, P., Zhang, C., . . . Wels, W. S. (2023). Intracranial injection of NK cells engineered with a HER2-targeted chimeric antigen receptor in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad087>
- Castriconi, R., Dondero, A., Augugliaro, R., Cantoni, C., Carnemolla, B., Sementa, A. R., Negri, F., Conte, R., Corrias, M. V., Moretta, L., Moretta, A., & Bottino, C. (2004). Identification of 4lg-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34), 12640-12645. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405025101>
- Chandran, U. R., Luthra, S., Santana-Santos, L., Mao, P., Kim, S. H., Minata, M., Li, J., Benos, P. V., DeWang, M., Hu, B., Cheng, S. Y., Nakano, I., & Sobol, R. W. (2015). Gene expression profiling distinguishes proneural glioma

- stem cells from mesenchymal glioma stem cells. *Genom Data*, 5, 333-336. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.07.007>
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1670-1690. <https://doi.org/10.3390/cancers6031670>
- Chen, C. H., Chin, R. L., Hartley, G. P., Lea, S. T., Engel, B. J., Hsieh, C. E., Prasad, R., Roszik, J., Shingu, T., Lizee, G. A., Heimberger, A. B., Millward, S. W., Hu, J., Hong, D. S., & Curran, M. A. (2023). Novel murine glioblastoma models that reflect the immunotherapy resistance profile of a human disease. *Neuro Oncol*, 25(8), 1415-1427. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad025>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522-526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>
- Chen, L., Chen, J., Xu, B., Wang, Q., Zhou, W., Zhang, G., Sun, J., Shi, L., Pei, H., Wu, C., & Jiang, J. (2015). B7-H3 expression associates with tumor invasion and patient's poor survival in human esophageal cancer. *Am J Transl Res*, 7(12), 2646-2660. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885263>
- Chen, Y. W., Tekle, C., & Fodstad, O. (2008). The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(5), 404-413. <https://doi.org/10.2174/156800908785133141>
- Chuntova, P., Chow, F., Watchmaker, P. B., Galvez, M., Heimberger, A. B., Newell, E. W., Diaz, A., DePinho, R. A., Li, M. O., Wherry, E. J., Mitchell, D., Terabe, M., Wainwright, D. A., Berzofsky, J. A., Herold-Mende, C., Heath, J. R., Lim, M., Margolin, K. A., Chiocca, E. A., . . . Okada, H. (2021). Unique challenges for glioblastoma immunotherapy-discussions across neuro-oncology and non-neuro-oncology experts in cancer immunology. Meeting Report from the 2019 SNO Immuno-Oncology Think Tank. *Neuro Oncol*, 23(3), 356-375. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa277>
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., Stakhovsky, E. A., Walker, J. R., Simin, K., Lyle, S., Fuessel, S., Erdmann, K., Wirth, M. P., Krause, M., Baumann, M., & Dubrovskaya, A. (2015). Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by beta-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res*, 75(7), 1482-1494. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1924>
- Del Bufalo, F., De Angelis, B., Caruana, I., Del Baldo, G., De Ioris, M. A., Serra, A., Mastronuzzi, A., Cefalo, M. G., Pagliara, D., Amicucci, M., Li Pira, G.,

- Leone, G., Bertaina, V., Sinibaldi, M., Di Cecca, S., Guercio, M., Abbaszadeh, Z., Iaffaldano, L., Gunetti, M., . . . Precision Medicine Team, I. O. P. B. G. (2023). GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med*, 388(14), 1284-1295. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2210859>
- Eckert, F., Gaipf, U. S., Niedermann, G., Hettich, M., Schilbach, K., Huber, S. M., & Zips, D. (2017). Beyond checkpoint inhibition - Immunotherapeutical strategies in combination with radiation. *Clin Transl Radiat Oncol*, 2, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2016.12.006>
- Flugel, C. L., Majzner, R. G., Krenciute, G., Dotti, G., Riddell, S. R., Wagner, D. L., & Abou-El-Enein, M. (2023). Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, 20(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00704-3>
- Gameiro, S. R., Jammeh, M. L., Wattenberg, M. M., Tsang, K. Y., Ferrone, S., & Hodge, J. W. (2014). Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget*, 5(2), 403-416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1719>
- Ganser, K., Eckert, F., Riedel, A., Stransky, N., Paulsen, F., Noell, S., Krueger, M., Schittenhelm, J., Beck-Wodl, S., Zips, D., Ruth, P., Huber, S. M., & Klumpp, L. (2022). Patient-individual phenotypes of glioblastoma stem cells are conserved in culture and associate with radioresistance, brain infiltration and patient prognosis. *Int J Cancer*, 150(10), 1722-1733. <https://doi.org/10.1002/ijc.33950>
- Getu, A. A., Tigabu, A., Zhou, M., Lu, J., Fodstad, O., & Tan, M. (2023). New frontiers in immune checkpoint B7-H3 (CD276) research and drug development. *Mol Cancer*, 22(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01751-9>
- Gong, J. H., Maki, G., & Klingemann, H. G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8(4), 652-658. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8152260>
- Grote, S., Chan, K. C.-H., Baden, C., Bösmüller, H., Sulyok, M., Frauenfeld, L., Ebinger, M., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2021). CD276 as a novel CAR NK-92 therapeutic target for neuroblastoma. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY*, 4(1), e105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/acg2.105>
- Grote, S., Urena-Bailén, G., Chan, K. C., Baden, C., Mezger, M., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2021). In Vitro Evaluation of CD276-CAR NK-92 Functionality, Migration and Invasion Potential in the Presence of Immune Inhibitory Factors of the Tumor Microenvironment. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051020>
- Grote, S., Ureña-Bailén, G., Chan, K. C., Baden, C., Mezger, M., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2021). In Vitro Evaluation of CD276-CAR NK-92



- Functionality, Migration and Invasion Potential in the Presence of Immune Inhibitory Factors of the Tumor Microenvironment. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051020>
- Guo, X., Chang, M., Wang, Y., Xing, B., & Ma, W. (2023). B7-H3 in Brain Malignancies: Immunology and Immunotherapy. *Int J Biol Sci*, 19(12), 3762-3780. <https://doi.org/10.7150/ijbs.85813>
- Gupta, A. K., & Daigle, D. (2016). Nivolumab for Metastatic Melanoma. *Skin Therapy Lett*, 21(2), 6-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223114>
- Hashiguchi, M., Kobori, H., Ritprajak, P., Kamimura, Y., Kozono, H., & Azuma, M. (2008). Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30), 10495-10500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802423105>
- Hauth, F., Ho, A. Y., Ferrone, S., & Duda, D. G. (2021). Radiotherapy to Enhance Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapeutic Efficacy in Solid Tumors: A Narrative Review. *JAMA Oncol*, 7(7), 1051-1059. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.0168>
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*, 79(18), 4557-4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Huang, Q., Zheng, Y., Gao, Z., Yuan, L., Sun, Y., & Chen, H. (2021). Comparative Efficacy and Safety of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Patients with Solid Tumors: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-analysis. *J Cancer*, 12(4), 1133-1143. <https://doi.org/10.7150/jca.49325>
- Huang, Y., Zhang, H. L., Li, Z. L., Du, T., Chen, Y. H., Wang, Y., Ni, H. H., Zhang, K. M., Mai, J., Hu, B. X., Huang, J. H., Zhou, L. H., Yang, D., Peng, X. D., Feng, G. K., Tang, J., Zhu, X. F., & Deng, R. (2021). FUT8-mediated aberrant N-glycosylation of B7H3 suppresses the immune response in triple-negative breast cancer. *Nat Commun*, 12(1), 2672. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22618-x>
- Iglesia, M. D., Parker, J. S., Hoadley, K. A., Serody, J. S., Perou, C. M., & Vincent, B. G. (2016). Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. *J Natl Cancer Inst*, 108(11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw144>
- Imber, B. S., Sadelain, M., DeSelm, C., Batlevi, C., Brentjens, R. J., Dahi, P. B., Giral, S., Park, J. H., Sauter, C., Scordo, M., Shah, G., Perales, M. A., Palomba, M. L., & Yahalom, J. (2020). Early experience using salvage radiotherapy for relapsed/refractory non-Hodgkin lymphomas after CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy. *Br J Haematol*, 190(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/bjh.16541>
- Jarosz-Biej, M., Smolarczyk, R., Cichon, T., & Kulach, N. (2019). Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133212>

- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., & Zeng, Z. (2019). Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>
- June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S., & Milone, M. C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 359(6382), 1361-1365. <https://doi.org/10.1126/science.aar6711>
- Kanchan, R. K., Perumal, N., Atri, P., Chirravuri Venkata, R., Thapa, I., Klinkebiel, D. L., Donson, A. M., Perry, D., Punsoni, M., Talmon, G. A., Coulter, D. W., Boue, D. R., Snuderl, M., Nasser, M. W., Batra, S. K., Vibhakar, R., & Mahapatra, S. (2020). MiR-1253 exerts tumor-suppressive effects in medulloblastoma via inhibition of CDK6 and CD276 (B7-H3). *Brain Pathol*, 30(4), 732-745. <https://doi.org/10.1111/bpa.12829>
- Kath, J., Du, W., Martini, S., Elsallab, M., Franke, C., Hartmann, L., Drosdek, V., Glaser, V., Stein, M., Schmueck-Henneresse, M., Reinke, P., Volk, H. D., Abou-El-Enein, M., & Wagner, D. L. (2023). CAR NK-92 cell-mediated depletion of residual TCR+ cells for ultrapure allogeneic TCR-deleted CAR T-cell products. *Blood Adv*, 7(15), 4124-4134. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009397>
- Kepp, O., Tesniere, A., Schlemmer, F., Michaud, M., Senovilla, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis*, 14(4), 364-375. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0303-9>
- Kim, J. Y., Son, Y. O., Park, S. W., Bae, J. H., Chung, J. S., Kim, H. H., Chung, B. S., Kim, S. H., & Kang, C. D. (2006). Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Exp Mol Med*, 38(5), 474-484. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.56>
- Kong, D. S., Nam, D. H., Kang, S. H., Lee, J. W., Chang, J. H., Kim, J. H., Lim, Y. J., Koh, Y. C., Chung, Y. G., Kim, J. M., & Kim, C. H. (2017). Phase III randomized trial of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy for newly diagnosed glioblastoma in Korea. *Oncotarget*, 8(4), 7003-7013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12273>
- Kontos, F., Michelakos, T., Kurokawa, T., Sadagopan, A., Schwab, J. H., Ferrone, C. R., & Ferrone, S. (2021). B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 27(5), 1227-1235. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2584>
- Kulzer, L., Rubner, Y., Deloch, L., Allgauer, A., Frey, B., Fietkau, R., Dorrie, J., Schaft, N., & Gaipl, U. S. (2014). Norm- and hypo-fractionated radiotherapy is capable of activating human dendritic cells. *J Immunotoxicol*, 11(4), 328-336. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.880533>
- Lee, Y. H., Martin-Orozco, N., Zheng, P., Li, J., Zhang, P., Tan, H., Park, H. J., Jeong, M., Chang, S. H., Kim, B. S., Xiong, W., Zang, W., Guo, L., Liu, Y.,

- Dong, Z. J., Overwijk, W. W., Hwu, P., Yi, Q., Kwak, L., . . . Dong, C. (2017). Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function. *Cell Res*, 27(8), 1034-1045. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.90>
- Leitner, J., Klausner, C., Pickl, W. F., Stockl, J., Majdic, O., Bardet, A. F., Kreil, D. P., Dong, C., Yamazaki, T., Zlabinger, G., Pfistershammer, K., & Steinberger, P. (2009). B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREM2 interaction. *Eur J Immunol*, 39(7), 1754-1764. <https://doi.org/10.1002/eji.200839028>
- Lim, M., Weller, M., Idbaih, A., Steinbach, J., Finocchiaro, G., Raval, R. R., Anstas, G., Baehring, J., Taylor, J. W., Honnorat, J., Petrecca, K., De Vos, F., Wick, A., Sumrall, A., Sahebjam, S., Mellinghoff, I. K., Kinoshita, M., Roberts, M., Slepets, R., . . . Omuro, A. (2022). Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. *Neuro Oncol*, 24(11), 1935-1949. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac116>
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., . . . Rezvani, K. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*, 382(6), 545-553. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu, F., Zhang, T., Zou, S., Jiang, B., & Hua, D. (2015). B7-H3 promotes cell migration and invasion through the Jak2/Stat3/MMP9 signaling pathway in colorectal cancer. *Mol Med Rep*, 12(4), 5455-5460. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4050>
- Liu, H., Tekle, C., Chen, Y. W., Kristian, A., Zhao, Y., Zhou, M., Liu, Z., Ding, Y., Wang, B., Maelandsmo, G. M., Nesland, J. M., Fodstad, O., & Tan, M. (2011). B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation. *Mol Cancer Ther*, 10(6), 960-971. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0072>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lugade, A. A., Sorensen, E. W., Gerber, S. A., Moran, J. P., Frelinger, J. G., & Lord, E. M. (2008). Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J Immunol*, 180(5), 3132-3139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3132>
- Ma, Y., Adjemian, S., Yang, H., Catani, J. P., Hannani, D., Martins, I., Michaud, M., Kepp, O., Sukkurwala, A. Q., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2013). ATP-dependent recruitment, survival and differentiation of dendritic cell precursors in the tumor bed after anticancer

- chemotherapy. *Oncoimmunology*, 2(6), e24568.  
<https://doi.org/10.4161/onci.24568>
- Ma, Y., Wang, R., Lu, H., Li, X., Zhang, G., Fu, F., Cao, L., Zhan, S., Wang, Z., Deng, Z., Shi, T., Zhang, X., & Chen, W. (2020). B7-H3 promotes the cell cycle-mediated chemoresistance of colorectal cancer cells by regulating CDC25A. *J Cancer*, 11(8), 2158-2170. <https://doi.org/10.7150/jca.37255>
- Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov*, 8(10), 1219-1226. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0442>
- Maki, G., Klingemann, H. G., Martinson, J. A., & Tam, Y. K. (2001). Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*, 10(3), 369-383. <https://doi.org/10.1089/152581601750288975>
- Martinez, M., & Moon, E. K. (2019). CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00128>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., . . . Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 439-448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- Mellman, I., Chen, D. S., Powles, T., & Turley, S. J. (2023). The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype. *Immunity*, 56(10), 2188-2205. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.09.011>
- Narita, Y., Arakawa, Y., Yamasaki, F., Nishikawa, R., Aoki, T., Kanamori, M., Nagane, M., Kumabe, T., Hirose, Y., Ichikawa, T., Kobayashi, H., Fujimaki, T., Goto, H., Takeshima, H., Ueba, T., Abe, H., Tamiya, T., Sonoda, Y., Natsume, A., . . . Terasaki, M. (2019). A randomized, double-blind, phase III trial of personalized peptide vaccination for recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 21(3), 348-359. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyy200>
- Nduom, E. K., Wei, J., Yaghi, N. K., Huang, N., Kong, L. Y., Gabrusiewicz, K., Ling, X., Zhou, S., Ivan, C., Chen, J. Q., Burks, J. K., Fuller, G. N., Calin, G. A., Conrad, C. A., Creasy, C., Ritthipichai, K., Radvanyi, L., & Heimerlberger, A. B. (2016). PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 18(2), 195-205. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov172>
- Nehama, D., Di Ianni, N., Musio, S., Du, H., Patane, M., Pollo, B., Finocchiaro, G., Park, J. J. H., Dunn, D. E., Edwards, D. S., Damrauer, J. S., Hudson, H., Floyd, S. R., Ferrone, S., Savoldo, B., Pellegatta, S., & Dotti, G. (2019). B7-H3-redirected chimeric antigen receptor T cells target glioblastoma and neurospheres. *EBioMedicine*, 47, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.030>

- Nehama, D., Di Ianni, N., Musio, S., Du, H., Patané, M., Pollo, B., Finocchiaro, G., Park, J. J. H., Dunn, D. E., Edwards, D. S., Damrauer, J. S., Hudson, H., Floyd, S. R., Ferrone, S., Savoldo, B., Pellegatta, S., & Dotti, G. (2019). B7-H3-redirected chimeric antigen receptor T cells target glioblastoma and neurospheres. *EBioMedicine*, 47, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.030>
- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., & Facchini, A. (2001). Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(6), 1131-1135. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001>
- Ning, Z., Liu, Y., Guo, D., Lin, W. J., & Tang, Y. (2023). Natural killer cells in the central nervous system. *Cell Commun Signal*, 21(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01324-9>
- Omuro, A., Brandes, A. A., Carpentier, A. F., Idbaih, A., Reardon, D. A., Cloughesy, T., Sumrall, A., Baehring, J., van den Bent, M., Bahr, O., Lombardi, G., Mulholland, P., Tabatabai, G., Lassen, U., Sepulveda, J. M., Khasraw, M., Vauleon, E., Muragaki, Y., Di Giacomo, A. M., . . . Weller, M. (2023). Radiotherapy combined with nivolumab or temozolomide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter: An international randomized phase III trial. *Neuro Oncol*, 25(1), 123-134. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac099>
- Pan, K., Farrukh, H., Chittepu, V., Xu, H., Pan, C. X., & Zhu, Z. (2022). CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *J Exp Clin Cancer Res*, 41(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suva, M. L., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190), 1396-1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Persa, E., Balogh, A., Safrany, G., & Lumnitzky, K. (2015). The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease. *Cancer Lett*, 368(2), 252-261. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.003>
- Portillo, A. L., Hogg, R., Poznanski, S. M., Rojas, E. A., Cashell, N. J., Hammill, J. A., Chew, M. V., Shenouda, M. M., Ritchie, T. M., Cao, Q. T., Hirota, J. A., Dhesy-Thind, S., Bramson, J. L., & Ashkar, A. A. (2021). Expanded human NK cells armed with CAR uncouple potent anti-tumor activity from off-tumor toxicity against solid tumors. *iScience*, 24(6), 102619. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102619>
- Prasad, D. V., Nguyen, T., Li, Z., Yang, Y., Duong, J., Wang, Y., & Dong, C. (2004). Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol*, 173(4), 2500-2506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2500>

- Qu, C., Ping, N., Kang, L., Liu, H., Qin, S., Wu, Q., Chen, X., Zhou, M., Xia, F., Ye, A., Kong, D., Li, C., Yu, L., Wu, D., & Jin, Z. (2020). Radiation Priming Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma With High Tumor Burden. *J Immunother*, 43(1), 32-37. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000284>
- Quach, H. T., Skovgard, M. S., Villena-Vargas, J., Bellis, R. Y., Chintala, N. K., Amador-Molina, A., Bai, Y., Banerjee, S., Saini, J., Xiong, Y., Vista, W. R., Byun, A. J., De Biasi, A., Zeltsman, M., Mayor, M., Morello, A., Mittal, V., Gomez, D. R., Rimner, A., . . . Adusumilli, P. S. (2023). Tumor-Targeted Nonablative Radiation Promotes Solid Tumor CAR T-cell Therapy Efficacy. *Cancer Immunol Res*, 11(10), 1314-1331. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-22-0840>
- Rafiq, S., Hackett, C. S., & Brentjens, R. J. (2020). Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 17(3), 147-167. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>
- Reardon, D. A., Brandes, A. A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M. S., Roth, P., Bahr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J. M., De Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwirter, R., Sampson, J., & Weller, M. (2020). Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 6(7), 1003-1010. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.1024>
- Riedel, A., Klumpp, L., Menegakis, A., De-Colle, C., Huber, S. M., Schittenhelm, J., Neumann, M., Noell, S., Tatagiba, M., & Zips, D. (2021). gammaH2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture. *Radiother Oncol*, 159, 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.03.023>
- Sadelain, M., Brentjens, R., & Riviere, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, 3(4), 388-398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>
- Smith, E. L., Mailankody, S., Staehr, M., Wang, X., Senechal, B., Purdon, T. J., Daniyan, A. F., Geyer, M. B., Goldberg, A. D., Mead, E., Santomasso, B. D., Landa, J., Rimner, A., Riviere, I., Landgren, O., & Brentjens, R. J. (2019). BCMA-Targeted CAR T-cell Therapy plus Radiotherapy for the Treatment of Refractory Myeloma Reveals Potential Synergy. *Cancer Immunol Res*, 7(7), 1047-1053. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0551>
- Smith, J. C., & Sheltzer, J. M. (2022). Genome-wide identification and analysis of prognostic features in human cancers. *Cell Rep*, 38(13), 110569. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110569>
- Solocinski, K., Padget, M. R., Fabian, K. P., Wolfson, B., Cecchi, F., Hembrough, T., Benz, S. C., Rabizadeh, S., Soon-Shiong, P., Schlom, J., & Hodge, J. W. (2020). Overcoming hypoxia-induced functional suppression of NK cells. *J Immunother Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000246>

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Suh, W. K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P. S., . . . Mak, T. W. (2003). The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*, 4(9), 899-906. <https://doi.org/10.1038/ni967>
- Tam, Y. K., Martinson, J. A., Doligosa, K., & Klingemann, H. G. (2003). Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy*, 5(3), 259-272. <https://doi.org/10.1080/14653240310001523>
- Tam, Y. K., Miyagawa, B., Ho, V. C., & Klingemann, H. G. (1999). Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *J Hematother*, 8(3), 281-290. <https://doi.org/10.1089/106161299320316>
- Tang, S. Y., Zha, S., Du, Z., Zeng, J., Zhu, D., Luo, Y., & Wang, S. (2021). Targeted integration of EpCAM-specific CAR in human induced pluripotent stem cells and their differentiation into NK cells. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 580. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02648-4>
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A. P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D., & Yu, J. (2018). First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*, 8(6), 1083-1089. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30034945>
- Taylor, B. C., & Balko, J. M. (2022). Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response. *Front Immunol*, 13, 844866. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866>
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O. G., & Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, 15(12), 1563-1570. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.017>
- Trapani, J. A. (2005). The dual adverse effects of TGF-beta secretion on tumor progression. *Cancer Cell*, 8(5), 349-350. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.018>
- Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M. J., Sarfraz, Y., Diamond, J. M., Schneider, R. J., Inghirami, G., Coleman, C. N., Formenti, S. C., &

- Demaria, S. (2017). DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*, 8, 15618. <https://doi.org/10.1038/ncomms15618>
- Vanpouille-Box, C., Formenti, S. C., & Demaria, S. (2017). TREX1 dictates the immune fate of irradiated cancer cells. *Oncoimmunology*, 6(9), e1339857. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1339857>
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., . . . Cancer Genome Atlas Research, N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Wang, L., Kang, F. B., Sun, N., Wang, J., Chen, W., Li, D., & Shan, B. E. (2016). The tumor suppressor miR-124 inhibits cell proliferation and invasion by targeting B7-H3 in osteosarcoma. *Tumour Biol*, 37(11), 14939-14947. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5386-2>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y. H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauve, C. G., Olar, A., . . . Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42-56 e46. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Wang, Y. A., Li, X. L., Mo, Y. Z., Fan, C. M., Tang, L., Xiong, F., Guo, C., Xiang, B., Zhou, M., Ma, J., Huang, X., Wu, X., Li, Y., Li, G. Y., Zeng, Z. Y., & Xiong, W. (2018). Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Mol Cancer*, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0913-y>
- Wang, Z. S., Zhong, M., Bian, Y. H., Mu, Y. F., Qin, S. L., Yu, M. H., & Qin, J. (2016). MicroRNA-187 inhibits tumor growth and invasion by directly targeting CD276 in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(28), 44266-44276. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10023>
- Weiss, T., Schneider, H., Silginer, M., Steinle, A., Pruschy, M., Polic, B., Weller, M., & Roth, P. (2018). NKG2D-Dependent Antitumor Effects of Chemotherapy and Radiotherapy against Glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 24(4), 882-895. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1766>
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D. D., Recht, L. D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S. A., Iwamoto, F., Drappatz, J., O'Rourke, D. M., Wong, M., Hamilton, M. G., Finocchiaro, G., Perry, J., Wick, W., Green, J.,



- He, Y., . . . investigators, A. I. t. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18(10), 1373-1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X)
- Wing, K., & Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*, 11(1), 7-13. <https://doi.org/10.1038/ni.1818>
- Wick W. et al., Gliome, S2k-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (12.06.2024)
- Wrzesinski, S. H., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res*, 13(18 Pt 1), 5262-5270. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1157>
- Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*, 19(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01238-x>
- Xie, G., Dong, H., Liang, Y., Ham, J. D., Rizwan, R., & Chen, J. (2020). CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*, 59, 102975. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102975>
- Xu, H., Cheung, I. Y., Guo, H. F., & Cheung, N. K. (2009). MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res*, 69(15), 6275-6281. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4517>
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H. G., Dennig, D., Childs, B. H., McGuirk, J., & O'Reilly, R. J. (1998). Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res*, 4(11), 2859-2868. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829753>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*, 31(6), 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>
- Yang, X., Feng, K. X., Li, H., Wang, L., & Xia, H. (2020). MicroRNA-199a Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion and Activates AKT/mTOR Signaling Pathway by Targeting B7-H3 in Cervical Cancer. *Technol Cancer Res Treat*, 19, 1533033820942245. <https://doi.org/10.1177/1533033820942245>
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., & Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*, 190(7), 3783-3797. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>

- Yuan, H., Wei, X., Zhang, G., Li, C., Zhang, X., & Hou, J. (2011). B7-H3 over expression in prostate cancer promotes tumor cell progression. *J Urol*, 186(3), 1093-1099. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.04.103>
- Zhang, J., Zheng, H., & Diao, Y. (2019). Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020317>
- Zhang, P., Yu, S., Li, H., Liu, C., Li, J., Lin, W., Gao, A., Wang, L., Gao, W., & Sun, Y. (2015). ILT4 drives B7-H3 expression via PI3K/AKT/mTOR signalling and ILT4/B7-H3 co-expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *FEBS Lett*, 589(17), 2248-2256. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.037>
- Zhang, Y., He, L., Sadagopan, A., Ma, T., Dotti, G., Wang, Y., Zheng, H., Gao, X., Wang, D., DeLeo, A. B., Fan, S., Sun, R., Yu, L., Zhang, L., Wang, G., Ferrone, S., & Wang, X. (2021). Targeting Radiation-Resistant Prostate Cancer Stem Cells by B7-H3 CAR T Cells. *Mol Cancer Ther*, 20(3), 577-588. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0446>
- Zhou, W. T., & Jin, W. L. (2021). B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 12, 701006. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701006>

## **10. Erklärung und Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen in der Abteilung für experimentelle Radioonkologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber durchgeführt. Sämtliche in dieser Arbeit abgebildeten Ergebnisse wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Katrin Ganser, Nicolai Stransky, Lisa Zirjacks und Heidrun Faltin) von mir eigenständig in Kooperation mit Nicolai Stransky erarbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber und Nicolai Stransky durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Bezugnehmend auf die Veröffentlichung: „Stransky et al, Chimeric antigen receptor NK-92 cell function is modulated by HLA class I expression of target cells“ (Manuskript eingereicht), in welcher ich bei der Durchführung und Datenkuration für Fig. 1 beteiligt war.

## **11. Veröffentlichung**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen, „Chimeric antigen receptor NK-92 cell function is modulated by HLA class I expression of target cells“ (Stransky et al., 2024) zur Veröffentlichung eingereicht.

Nicolai Stransky, Ranran Ji, Lukas Prause, Katrin Ganser, Winfried S. Wels, Peter Ruth, Stephan M. Huber und Franziska Eckert; “Chimeric antigen receptor NK-92 cell function is modulated by HLA class I expression of target cells”

## **12. Danksagung**

Ich möchte mich an Allen beteiligten Personen einen großen Dank aussprechen, die mich im Rahmen dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Huber und Frau Prof. Dr. Franziska Eckert für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der experimentellen Radioonkologie bedanken. Allen Voran meinem Betreuer und Freund Nicolai Stransky, welcher mich mit wertvollen Gesprächen und hilfreichen Anregungen begleitet hat. Außerdem danke ich Katrin Ganser und Heidi Faltin für Ihre fachliche und persönliche Unterstützung über den gesamten Zeitraum.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, und meiner Freundin für ihren ermutigenden Zuspruch und ihrer Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.