

Aus der Klinik für Nuklearmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Markus Luster

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**CAR-T-Zellen erkennen und eliminieren den
Thyreotropin-Rezeptor exprimierende differenzierte
Schilddrüsenkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Human-
medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nicola R. Spieker

aus Bocholt

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

am: 13.01.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: **Prof. Dr. rer. nat. Helmut Schäfer**

Referent: Prof. Dr. Dr. med. Frederik A. Verburg

Korreferent: Prof. Dr. med. Katharina Holzer

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Schilddrüsenkarzinome im Allgemeinen.....	1
1.1.1	Epidemiologie des Schilddrüsenkarzinoms	1
1.1.2	Risikofaktoren des Schilddrüsenkarzinoms	2
1.2	Schilddrüsenkarzinome mit Fokus auf das differenzierte Schilddrüsenkarzinom	3
1.2.1	Diagnostik des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms.....	4
1.2.2	Prognosefaktoren des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms	5
1.2.3	Therapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms	7
1.2.3.1	Operative Therapie	8
1.2.3.2	Adjuvante Radioiodtherapie	10
1.2.3.3	Thyreotropin-Suppression	11
1.2.4	Radioiodrefraktäres differenziertes Schilddrüsenkarzinom	12
1.3	Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen).....	14
1.3.1	Unterschiede zwischen T-Zellen und CAR-T-Zellen.....	15
1.3.2	Grundlegende Struktur eines chimären Antigenrezeptors (CAR) .	16
1.3.3	Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) als Zielantigen auf differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen.....	18
1.3.4	Aufbau des anti-TSHR CAR	20
1.3.5	Gefahren durch CAR-T-Zellen in vivo	22
1.3.6	Inkorporation eines Caspase-9-Suizidgens	23
1.4	Definition der Zielsetzung.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Vorbereitungen für die Zytotoxizitätsanalysen.....	25
2.1.1	Zellkultur des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms.....	25

2.1.2	Markierung der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen mit Green Fluorescent Protein (GFP)	26
2.1.3	Nachweis des Thyreotropin-Rezeptors in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133	26
2.1.3.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	27
2.1.3.2	Western Blot.....	28
2.1.4	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblutproben.....	32
2.1.5	Aktivierung der isolierten T-Zellen	33
2.1.6	Transduktion der isolierten T-Zellen mit dem anti-TSHR CAR	34
2.1.7	Nachweis der Bindung der anti-TSHR CAR-T-Zellen an den Thyreotropin-Rezeptor auf K-1- und FTC-133-Zellen	34
2.2	Zytotoxizitätsanalysen	35
2.2.1	Ko-Kultivierung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen und CAR-T-Zellen.....	35
2.2.2	Auswertung des Zelltods von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen in den Ko-Kulturen.....	37
2.2.2.1	Reduktion von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Mikroskop.....	37
2.2.2.2	Reduktion von GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop	38
2.2.2.3	Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse.....	38
2.2.3	Statistik.....	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Nachweis des Thyreotropin-Rezeptors in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133.....	42
3.1.1	Immunfluoreszenzfärbung	42
3.1.2	Western Blot	43
3.2	Anti-TSHR CAR-T-Zellen erkennen K-1- und FTC-133-Zellen.....	44

3.3	Zelltod von K-1- und FTC-133-Zellen in den Ko-Kulturen	44
3.3.1	Reduktion von K-1- und FTC-133-Zellen unter dem Mikroskop....	45
3.3.2	Reduktion von GFP-markierten K-1- und FTC-133-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop	46
3.3.3	Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse	47
4	DISKUSSION	51
4.1	Anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen gegen das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom	51
4.2	Kritik und Schwachstellen	52
4.2.1	Bedeutung des tumorspezifischen Antigens.....	52
4.2.2	Versuchsaufbau.....	53
4.3	Herausforderungen in der klinischen Anwendung.....	55
4.3.1	CAR-T-Zell-Penetration	55
4.3.2	CAR-T-Zell-Persistenz.....	57
4.4	Anregungen für die Weiterentwicklung.....	57
5	FAZIT.....	60
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	67
	LITERATURVERZEICHNIS	69
	DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	79
	ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	80
	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	81
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	85
	DANKSAGUNG.....	87
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	88

1 EINLEITUNG

1.1 Schilddrüsenkarzinome im Allgemeinen

1.1.1 Epidemiologie des Schilddrüsenkarzinoms

Das Schilddrüsenkarzinom repräsentiert die häufigste maligne endokrine Neoplasie. Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland etwa 4280 Frauen und 1840 Männer. Die Prognose für das Jahr 2018 ist steigend mit 4500 Neuerkrankungen bei den Frauen und 2200 Neuerkrankungen bei den Männern. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer in einem Verhältnis von mehr als 2:1. Das mittlere Erkrankungsalter im Jahr 2014 betrug bei Frauen 51 Jahre und bei Männern 55 Jahre, wobei darauf hinzuweisen ist, dass die Erkrankung gerade bei Frauen auch schon in jungem Alter auftreten kann (Robert Koch-Institut, 2017).

Der American Thyroid Association (ATA) zufolge zeigt die Inzidenz des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms einen stetigen Anstieg, während die Mortalitätsrate auffallend stabil auf einem niedrigen Niveau verbleibt. Derzeit stellt das Schilddrüsenkarzinom in den USA die fünfthäufigste Krebsdiagnose bei Frauen dar. Bis zum Jahre 2030 wird das differenzierte Schilddrüsenkarzinom laut Schätzungen der ATA bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die neunthäufigste Krebsdiagnose sein (Haugen, 2017).

Die statistischen Erhebungen des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts bestätigen die Aussagen der ATA. In Deutschland haben im Zeitraum von 1999 bis 2014 die altersstandardisierten Erkrankungsrate für beide Geschlechter erheblich zugenommen (Robert Koch-Institut, 2017). Bei Frauen stieg die altersstandardisierte Erkrankungsrate deutlich steiler als bei Männern, insbesondere in den Jahren 2004 bis 2009. Von diesem Anstieg waren ausschließlich die prognostisch günstigen papillären Karzinome betroffen, die zu dem differenzierten Schilddrüsenkarzinom gezählt werden, sowie überwiegend junge Erwachsene. In ähnlichem Ausmaß ist dieser Trend auch in anderen Ländern zu beobachten. Am ehesten wird dieses Phänomen auf verbesserte Untersuchungsmethoden zurückgeführt, insbesondere den Einsatz der Sonographie. Im Rahmen der Abklärung anderer Erkrankungen werden Schilddrü-

senkarzinome häufig als Zufallsbefund diagnostiziert (Haugen et al., 2016). Dennoch kann die erhöhte Rate an Diagnosestellungen die steigende Inzidenz nicht vollständig erklären (Pellegriti, Frasca, Regalbuto, Squatrito, & Vigneri, 2013). Die altersstandardisierten Sterberaten haben in geringem Maße abgenommen (Robert Koch-Institut, 2017).

Insbesondere bei Frauen werden Schilddrüsenkarzinome in der Mehrzahl der Fälle (63%) in einem frühen Stadium (T1) entdeckt. Mit relativen 5-Jahres-Überlebensraten von 94% bei Frauen und 87% bei Männern ist die Prognose sehr günstig. Eine Ausnahme bilden die anaplastischen Karzinome mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 10% (Robert Koch-Institut, 2017).

1.1.2 Risikofaktoren des Schilddrüsenkarzinoms

Der einzige gesicherte, wenn auch selten auftretende, umweltbezogene Risikofaktor für das Auftreten eines Schilddrüsenkarzinoms ist die Exposition der Schilddrüse gegenüber ionisierender Strahlung. So ist das Risiko beispielsweise erhöht, wenn die Schilddrüse während einer Strahlentherapie im Strahlenfeld liegt. Auch die Aufnahme von geringen Aktivitäten ^{131}I od, wie nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl 1986, erhöht das Risiko an einem Schilddrüsenkarzinom zu erkranken. Besonders bei Kindern ist Vorsicht geboten, da die Schilddrüse in diesem Alter außerordentlich strahlenempfindlich ist (Robert Koch-Institut, 2017).

Weitere ernährungs- oder lebensstilbezogene Risikofaktoren und Umweltrisiken sind derzeit nicht sicher belegt. Außerdem ist noch nicht vollständig aufgeklärt warum Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Robert Koch-Institut, 2017). Statisch fällt ein gehäuftes Auftreten von Schilddrüsenkarzinomen als Sekundärmalignom nach Mammakarzinomen und umgekehrt auf. Dies legt eine pathogenetische Verbindung nahe. Studien weisen darauf hin, dass Östradiol die Tumorgenese und –progression von Schilddrüsenkarzinomen fördert. Außerdem scheinen Östrogene die Sekretion von Thyreotropin (TSH = Thyroid Stimulating Hormone) zu fördern, welches bekanntermaßen ein Schilddrüsenwachs-

tumsfaktor ist. Die Studienlage weist darauf hin, dass nach Mammakarzinomen vor allem papilläre Schilddrüsenkarzinome als Sekundärmalignome auftreten, wobei der Zeitraum von Menarche bis zur Menopause als besonders gefährdend gilt (Nielsen et al., 2016). Sowohl beim Mamma- als auch beim Schilddrüsenkarzinom fällt eine Korrelation von Fettleibigkeit mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko auf (Nielsen et al., 2016). Dieses Phänomen kann ebenfalls über eine vermehrte Östrogensekretion erklärt werden, da Adipozyten das Enzym Aromatase exprimieren, welches eine Schlüsselrolle in der Östrogensynthese aus Androgenen einnimmt (Nelson & Bulun, 2001).

Das seltene medulläre Schilddrüsenkarzinom tritt mit 85% am häufigsten sporadisch auf, ist jedoch in 15% der Fälle mit der autosomal dominant vererbten Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2) assoziiert (V. Tiedje, 2015). Auch beim papillären Schilddrüsenkarzinom wird eine genetische Komponente vermutet (Robert Koch-Institut, 2017).

1.2 Schilddrüsenkarzinome mit Fokus auf das differenzierte Schilddrüsenkarzinom

Die bei Weitem häufigste Form des Schilddrüsenkarzinoms ist das differenzierte Schilddrüsenkarzinom zu dem das papilläre und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom zählen. Etwa 60-80% aller Schilddrüsenkarzinome entfallen auf das papilläre Schilddrüsenkarzinom und 10-15% auf das follikuläre Schilddrüsenkarzinom. Die restlichen 10-15% teilen sich auf die übrigen histologischen Subtypen auf: dem medullären Schilddrüsenkarzinom, dem gering differenzierten Schilddrüsenkarzinom und dem undifferenzierten/ anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012).

1.2.1 Diagnostik des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms

Aufgrund des typischerweise jahrelang indolenten Charakters werden etwa die Hälfte der differenzierten Schilddrüsenkarzinome als reine Zufallsbefunde erhoben (Paschke et al., 2015). Zur systematischen Schilddrüsenknotendiagnostik gehören die klinische Untersuchung, die Sonographie und die Szintigraphie. Malignomsuspekte Merkmale eines Schilddrüsenknotens in der Sonographie sind unter anderem eine Größe > 4 cm, solide hypoechogene Anteile, unscharfe Begrenzungen, Mikrokalzifikationen, randständige Verkalkungen, eine Morphologie, die höher als breit ist, sowie der Nachweis einer extrathyreoidalen Ausbreitung (Haugen et al., 2016; Tuttle et al., 2010). In der Schilddrüsen-Szintigraphie kann ein sogenannter „kalter“ Knoten mit vermindertem oder fehlendem Stoffwechsel auf ein malignes Geschehen hinweisen. Allerdings sind nur 2% aller detektierten kalten Knoten tatsächlich maligne (Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, 2016). Darüber hinaus gehen fokale Aufnahmen der Schilddrüse im Rahmen von ^{18}F -FDG-PET/CT-Scans mit einem erhöhten Malignitätsrisiko einher und erfordern eine weitere Abklärung (Treglia et al., 2013).

Im Falle eines malignitätssuspekten Befundes wird eine Feinnadelbiopsie durchgeführt, meist sonographiegesteuert. Sie ist die bedeutsamste Komponente in der Diagnostik eines Schilddrüsenkarzinoms, da mithilfe der Zytopathologie die verlässlichste Aussage über die Dignität des Knotens getroffen werden kann. Sie dient als Grundlage für die Entscheidung über eine Thyreoidektomie. Diese wird abhängig vom sonographischen und palpatorischen Befund von einer zervikalen zentralen und gegebenenfalls auch lateralen Lymphknotenentfernung begleitet (Rothmund, 2013).

Nur selten weisen Indikatoren wie eine Tumorinfiltration des N. laryngeus recurrens mit persistierender Heiserkeit, Schluckstörungen, ein merkbares Tumorstadium oder symptomatische zervikale Lymphknotenmetastasen auf ein bestehendes Schilddrüsenkarzinom hin (Paschke et al., 2015). Lymphknotenmetastasen treten vor allem beim papillären Schilddrüsenkarzinom auf, wohinge-

gen das follikuläre Schilddrüsenkarzinom vorwiegend hämatogen metastasiert (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012).

1.2.2 Prognosefaktoren des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms

Zu den relevantesten Prognosefaktoren des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms gehören epidemiologische Daten, die Primärtumorgröße, die Tumorphistologie und das Vorliegen von Metastasen.

Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der wohl wichtigste Prognosefaktor bezüglich der Mortalität. Schilddrüsenkarzinome zeigen bei Patienten > 40 Jahren häufiger einen tödlichen Verlauf als in jüngeren Jahren. Die Mortalität steigt mit jeder folgenden Lebensdekade. Nach Vollendung des 60. Lebensjahres zeigt die Mortalitätsrate zudem einen dramatischen Sprung (Network, 2019). Männer erliegen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 87% im Vergleich zu 94% bei Frauen häufiger dem Schilddrüsenkarzinom (Robert Koch-Institut, 2017). Die Rezidivrate ist am höchsten bei Patienten < 20 Jahren oder > 60 Jahren (Mazzaferri & Jhiang, 1994).

Papilläre Mikrokarzinome sind definitionsgemäß kleiner als 1 cm und werden in der Regel inzidentell gefunden. Treten sie solitär auf, ist ihre Rezidivrate und krankheitsspezifische Mortalität verschwindend gering (Baudin et al., 1998). In 20% der Fälle jedoch treten papilläre Mikrokarzinome multifokal auf und verursachen in 60% zervikale Lymphknotenmetastasen (Sugino et al., 1998), was wiederum in Diskussion steht mit einem erhöhten Auftreten von Fernmetastasen einherzugehen (Baudin et al., 1998). Sowohl papilläre als auch follikuläre Schilddrüsenkarzinome, die auf eine Größe von 1,5 cm und auf das Schilddrüsengewebe begrenzt sind, verursachen nur extrem selten Fernmetastasen. Im Vergleich zu Tumoren > 1,5 cm ist die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Tumoren ≤ 1,5 cm nur ein Drittel so hoch und die krankheitsspezifische Mortalität innerhalb von 30 Jahren nur 0,4% gegenüber 7% (Mazzaferri & Jhiang, 1994). Die Gesamtprognose für papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome ist zunehmend schlecht je größer die Primärtumorgröße (Brennan, Bergstralh, van

Heerden, & McConahey, 1991). Es besteht ein annähernd lineares Verhältnis zwischen der Primärtumorgröße und der Rezidivwahrscheinlichkeit sowie der krankheitsspezifischen Mortalität (Mazzaferri & Jhiang, 1994).

Eine gut definierte Tumorkapsel, wie sie bei etwa 10% der papillären Schilddrüsenkarzinome zu finden ist, stellt einen sehr günstigen Prognoseindikator dar. Eine schlechte Prognose hingegen wird im Falle eines papillären Schilddrüsenkarzinoms mit einer anaplastischen Tumortransformation oder mit den großzelligen, kolumnären und diffus sklerosierenden Varianten verbunden (Sherman, 2003). Die follikuläre Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms weist gegenüber der konventionellen Variante keine beeinträchtigte Prognose auf (Tielens, Sherman, Hruban, & Ladenson, 1994).

Follikuläre Schilddrüsenkarzinome sind typischerweise solitäre Knoten mit einer umgebenden Kapsel. Während eine Kapselinvasion als unbedrohlich angesehen wird, steht eine Angioinvasion für eine schlechte Prognose (van Heerden et al., 1992). Liegt keine Angioinvasion vor, wird die Wahrscheinlichkeit von Fernmetastasen deutlich reduziert und damit auch die Mortalität (LiVolsi & Asa, 1994). Eine Variante stellt der sogenannte Hürthle-Zell-Tumor dar, auch onkozytäres Schilddrüsenkarzinom genannt. Hürthle-Zell-Tumoren können aggressive Verläufe aufweisen, insbesondere bei Vorliegen einer Angioinvasion oder bei großen Tumoren und alten Patienten (Lopez-Penabad et al., 2003). Im Vergleich zum papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinom ist die Fähigkeit ¹³¹Iod zu speichern in Hürthle-Zell-Tumoren vermindert. Dies gilt auch für pulmonale Metastasen des Hürthle-Zell-Tumors, die in nur etwa 36% der Fälle ¹³¹Iod speichern im Vergleich zu 64% bei Patienten, die an einem follikulären Schilddrüsenkarzinom leiden, und zu 60% bei Patienten, die an einem papillären Schilddrüsenkarzinom leiden (Samaan, Schultz, Haynie, & Ordonez, 1985).

Fernmetastasen gelten als Haupttodesursache im Rahmen eines papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Beinahe 10% der vom papillären Schilddrüsenkarzinom Betroffenen und etwa 25% der vom follikulären Schilddrüsenkarzinom Betroffenen entwickeln Fernmetastasen im Verlauf. Ungefähr 50% dieser Metastasen liegen bereits bei Diagnosestellung vor (Mazzaferri, 1993). Besonders stark prädispositioniert gegenüber Fernmetastasen sind Pati-

enten mit einem Hürthle-Zell-Tumor oder solche > 40 Jahre (Ruegemer et al., 1988; Samaan et al., 1985). Bei etwa 50% der Betroffenen sind die Fernmetastasen auf die Lunge begrenzt und bei etwa 20% sind nur die Knochen betroffen (Kim et al., 2018; Shaha, Shah, & Loree, 1997). Die Hauptprädikatoren für den Krankheitsverlauf bei Vorliegen von Fernmetastasen stellen das Patientenalter, der Metastasierungsort, die Fähigkeit ^{131}I zu speichern und im Falle von Lungenmetastasen die Morphologie im Röntgen-Thorax dar (Ruegemer et al., 1988). Etwa die Hälfte der Patienten mit pulmonalen Metastasen versterben innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung unabhängig von der Tumorphistologie (Mazzaferri, 1993).

Die prognostische Bedeutung von regionalen Lymphknotenmetastasen wird kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen regionalen Lymphknotenmetastasen und der Rezidivrate oder der krankheitsspezifischen Mortalität gibt (Hay, Bergstralh, Goellner, Ebersold, & Grant, 1993; Shaha, Loree, & Shah, 1995). Andere Studien wiederum postulieren das Gegenteil und zudem, dass Lymphknotenmetastasen mit dem Auftreten von Fernmetastasen korrelieren, insbesondere wenn bizervikale oder mediastinale Lymphknotenmetastasen vorliegen oder wenn die Lymphknotenkapsel durchbrochen wird (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Suh, Pak, Seok, & Kim, 2016).

1.2.3 Therapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms

Die Therapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms baut auf drei Säulen auf: der operativen Resektion, der adjuvanten Radioiodtherapie und der dauerhaften Thyreotropin-Suppression.

Es besteht Einigkeit darin, dass die perkutane Bestrahlung nach operativer Therapie im Allgemeinen keinen Stellenwert besitzt. Nur in bestimmten Fällen, wie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder bei Patienten höheren Alters mit extrathyreoidaler Ausbreitung, wird der additive Einsatz im Bereich des Nackens, des Schilddrüsenbetts und lokoregional diskutiert, jedoch auch das äußerst kontrovers (Haugen et al., 2016).

Chemotherapeutika zeigen in der Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome nur geringes Ansprechen bei Überwiegen unerwünschter Nebenwirkungen (Haugen & Sherman, 2013). Allenfalls bei progressiven Verläufen, die refraktär auf die etablierten Standardtherapien reagieren, kann über den Einsatz von Doxorubicin nachgedacht werden (Haugen & Sherman, 2013). Jedoch stehen bei vielen Patienten die schweren Nebenwirkungen wie Kardiomyopathie, Granulozytopenie mit begleitenden Infektionen, Übelkeit, Erbrechen, Infertilität und Alopezie dem Ausbleiben durchgreifender Erfolge gegenüber (Haugen & Sherman, 2013). Folglich bleibt eine Therapie mit Doxorubicin auf eine hochselektive Patientengruppe begrenzt.

1.2.3.1 Operative Therapie

Die operative Therapie ist die primäre Therapieoption für Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom.

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom wird mit einer Thyreoidektomie behandelt. Hauptargumente für diese Empfehlung sind die Häufigkeit multifokaler Tumorerde, das Risiko einer lymphangischen Ausbreitung und die Ermöglichung einer postoperativen Radioioddiagnostik und –therapie. Zudem wird in Abhängigkeit von der Expertise des Operateurs eine zentrale Lymphknotenausräumung durchgeführt, welche zu einem akkuraten Staging beiträgt. Bei klinisch fehlendem Hinweis auf Lymphknotenmetastasen (cN0) gibt es keine eindeutige Empfehlung für oder gegen eine prophylaktische zentrale Lymphknotenausräumung. Vorteile einer zentralen Kompartmentdissektion sind das exakte histopathologische Staging, die Beseitigung häufiger Mikrolymphknotenmetastasen und die höhere Wahrscheinlichkeit einer Normalisierung des Tumormarkers Thyreoglobulin (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012). Nachteile sind der nicht gesicherte onkologische Vorteil und das höhere Komplikationsrisiko, wie zum Beispiel eine postoperative Hypokalzämie (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012). Eine laterale Kompartmentresektion wird nur bei präoperativem Metastasenverdacht oder

-nachweis durchgeführt (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012).

Kontroverse besteht in der Behandlung des häufigen papillären Mikrokarzinoms, das definitionsgemäß eine Größe von 1 cm nicht überschreitet. Die Prognose des papillären Mikrokarzinoms der Schilddrüse ist hervorragend. Eine Thyreoidektomie bietet keinen Überlebensvorteil gegenüber einer Hemithyreoidektomie. Es wird sogar diskutiert, ob eine Beobachtung im Sinne einer „Active Surveillance“ ausreicht (Ito & Miyauchi, 2018). Nach einer Thyreoidektomie wird die Überwachung und Behandlung eines Rezidivs oder einer Metastasierung erleichtert, indem die Bestimmung des Tumormarkers Thyroglobulin (Cooper et al., 2009) und gegebenenfalls eine Diagnostik und Therapie mittels radioaktivem ¹³¹Iod zum Einsatz kommen (Reiners, Hanscheid, Luster, Lassmann, & Verburg, 2011). Diese Möglichkeiten sind nach Hemithyreoidektomie oder unter alleiniger Beobachtung nur eingeschränkt sinnvoll.

Das Resektionsausmaß bei minimal-invasiven follikulären Schilddrüsenkarzinomen, die zwei Drittel der follikulären Karzinome ausmachen, wird anhand der vorliegenden Knoten bestimmt. Bei klinisch und zytologisch nicht dringend malignitätsverdächtigen Solitärknoten ist eine Thyreoidektomie nicht erforderlich. Intraoperativ wird ein Gefrierschnellschnitt durchgeführt, dessen Aussagekraft hinsichtlich der Abgrenzung gegenüber dem breit-invasiven follikulären Schilddrüsenkarzinom, der follikulären Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms und Adenomen nur begrenzt ist. Daher wird zur weiteren histologischen Aufarbeitung postoperativ zusätzlich ein Paraffinschnitt des Resektionspräparats durchgeführt. Im Falle einer Angioinvasion sollte innerhalb von vier Tagen eine Komplettierungsthyreoidektomie erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012).

Bei Vorliegen eines breit-invasiven follikulären Schilddrüsenkarzinoms wird eine Thyreoidektomie durchgeführt. Aufgrund der regelhaft nachgewiesenen Angioinvasion liegt eine hämatogene Metastasierung nahe. Nicht selten wird die Erkrankung über den Nachweis von Fernmetastasen diagnostiziert. Die Indikation zur Kompartimentresektion ist nur bei prä- oder intraoperativ nachgewiesener

Lymphknotenmetastasierung gegeben (Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, 2012).

1.2.3.2 Adjuvante Radioiodtherapie

Nach einer primär operativen Therapie kann zur Ablation von postoperativ verbliebenem Schilddrüsengewebe eine adjuvante Radioiodtherapie erforderlich sein. Zur Maximierung der Radioiodaufnahme in die Schilddrüsenkarzinomzellen erfolgt zuvor eine Thyreotropin-Stimulation, die die Anzahl von Natriumiodid-Symportern steigert. Dies wird entweder durch eine Schilddrüsenhormonkarenz oder durch rekombinantes humanes Thyreotropin (rhTSH) erzielt. Das im Anschluss systemisch applizierte radioaktive ^{131}I wird von gesunden und maligne transformierten Schilddrüsenzellen aufgenommen und führt durch radioaktive Zerfallsprozesse zur selektiven Bestrahlung mit lokal begrenzter Zytotoxizität. Ebenso zählen jodaufnehmende Lokalrezidive, Lymphknoten- und Fernmetastasen, sowie inoperable oder nicht vollständig resizierbare Tumoren zu den Zielstrukturen. Die adjuvante Radioiodtherapie erfolgt sowohl in kurativer als auch in palliativer Absicht (M. Dietlein, 2015).

Erst durch die adjuvante Radioiodtherapie werden optimale Voraussetzungen für die Nachsorge geschaffen. In der langfristigen onkologischen Überwachung dienen die Bestimmung des Serum-Thyreoglobulins als Tumormarker, die Sonographie und die ^{131}I -Ganzkörperszintigraphie der frühzeitigen Erkennung von iod-speichernden Rezidiven und Metastasen und damit der Minimierung der Mortalitätsrate (M. Dietlein, 2015). Prädiktive Faktoren für ein gutes Ansprechen des Tumors auf die Radioiodtherapie sind eine ^{131}I -Aufnahme durch den Tumor, junges Alter, eine gute histologische Differenzierung und eine geringe ^{18}F -FDG-Aufnahme (Haugen et al., 2016).

Für die Bestimmung der zu applizierenden Aktivität an ^{131}I zur initialen Radioiodtherapie wird ein Entscheidungskorridor zwischen 1 und 3,7 GBq empfohlen, der an die individuellen Gegebenheiten der Patienten anzupassen ist. Studien konnten zeigen, dass es bei initial niedrigen applizierten Aktivitäten gehäuft zur

Notwendigkeit einer zweiten Radioiodtherapie kommt (M. Dietlein, 2015; Verburg, 2014). Außerdem profitieren Patienten, die primär mit einer hohen applizierten Aktivität behandelt wurden, von einem verbesserten Langzeitüberleben (Verburg et al., 2014). Die Radioiodtherapie erfolgt aus Gründen des Strahlenschutzes ausschließlich in einem stationären Behandlungskonzept (Bundesministerium für Umwelt, 2011).

1.2.3.3 Thyreotropin-Suppression

Die Thyreotropin-Suppression (TSH-Suppression) findet Anwendung in der adjuvanten Langzeitbehandlung differenzierter Schilddrüsenkarzinome. Es wird eine milde, latent hyperthyreote Stoffwechsellage mittels einer hochdosierten Schilddrüsenhormonsubstitution induziert, wodurch das Thyreotropin supprimiert wird und damit auch sein Potential das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomzellen zu fördern. Bei Hochrisikopatienten wird durch eine Thyreotropin-Suppression eine Reduktion der Mortalität und der Progression von Metastasierungen beobachtet (Diessl et al., 2012). Vergleichbare Vorteile können bei Niedrigrisikopatienten nicht beobachtet werden, weswegen hier ein weniger aggressives Regime empfohlen wird. Bei der Thyreotropin-Suppression muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen den Risiken einer Krankheitsprogression und den Risiken einer langfristigen milden Hyperthyreose. Die Nebenwirkungen werden vor allem durch kardiovaskuläre Komplikationen, die Ausbildung einer Osteoporose mit Frakturneigung und ein thrombogenes Profil bestimmt. Studien zeigen jedoch, dass die Nebenwirkungen bei sachgerechter L-Thyroxin-Dosierung und sorgfältiger Überwachung begrenzt sind. Bei älteren Patienten und Patienten mit bekannter kardialer Erkrankung sollte die Thyreotropin-Suppression allerdings gänzlich vermieden werden (Pacini et al., 2006).

1.2.4 Radioiodrefraktäres differenziertes Schilddrüsenkarzinom

Das differenzierte Schilddrüsenkarzinom weist zwar eine sehr günstige Prognose auf, dennoch gibt es Patienten, die refraktär auf die bereits etablierten Therapiemöglichkeiten der operativen Resektion, der Radioiodtherapie und der Thyreotropin-Suppression reagieren. Die Sterberate in Deutschland je 100.000 Betroffener beträgt bei Männern 0,8 und bei Frauen 1,2 (Robert Koch-Institut, 2017). Bei Vorliegen von Fernmetastasen sinkt die sonst hervorragende 10-Jahres-Überlebensrate signifikant auf weniger als 15%, insbesondere wenn die Fernmetastasen keine Radioiodaufnahme zeigen. Nicht-radioiodsensible Fernmetastasen liegen in etwa zwei Dritteln der Fälle vor. Auf molekularer Ebene wird dies durch einen Verlust des Natrium-Iodid-Symporters begründet (Spitzberg, 2016). Selbst wenn die Metastasen initial eine ^{131}I -Aufnahme aufweisen, können nur etwa die Hälfte dieser mit wiederholten Radioiodanwendungen geheilt werden (Haugen et al., 2016).

Die American Thyroid Association (ATA) will der Entscheidungsfindung über den weiteren Therapieplan bei Vorliegen eines nicht-radioiodsensiblen differenzierten Schilddrüsenkarzinoms behilflich sein, indem sie die Möglichkeiten auf vier grundlegende Entscheidungen begrenzt (Haugen et al., 2016):

1. Engmaschiges Monitoring alle 3-12 Monate unter Thyreotropin-Suppression
2. Lokale Therapie (z.B. Resektion, Bestrahlung, Thermoablation)
3. Systemische Therapie (z.B. Kinase-Inhibitoren)
4. Angebot zur Teilnahme an einer klinischen Studie

Durch das verbesserte Verständnis zentraler Signaltransduktionswege und der Identifizierung potentieller Zielmoleküle konnten in den letzten Jahren gezielte Therapien entwickelt werden. Die zwei oralen Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib wurden vor einigen Jahren zur Therapie der radioiodrefraktären differenzierten Schilddrüsenkarzinome zugelassen.

Die Zielmoleküle von Sorafenib sind VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- β , RAF und RET. In der randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie DECISION

konnte das progressionsfrei Überleben auf 10,8 Monate im Interventionsarm im Vergleich zu 5,8 Monaten im Placeboarm verlängert werden (Brose et al., 2014). Bei 98,6% der Sorafenib-erhaltenden Studienteilnehmer traten Nebenwirkungen auf. Zu den häufigsten gehörten das Hand-Fuß-Syndrom (palmar-plantare Erythrodyssästhesie), Diarrhoe, Alopezie, Hautausschlag, Müdigkeit, Gewichtsabnahme und Hypertonie. Auch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Sekundärmalignome in Form von Plattenepithelkarzinomen der Haut wurden beobachtet (Brose et al., 2014). Die Ergebnisse der DECISION-Studie führten 2014 zur Zulassung in Europa für das progrediente, lokal fortgeschrittene oder metastasierte radioiodrefraktäre differenzierte Schilddrüsenkarzinom (Spitzberg, 2016).

Das Zielmolekülprofil von Lenvatinib weicht etwas von Sorafenib ab und umfasst VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- α , RET, c-KIT und FGFR-1, -2, -3, -4. In der randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie SELECT verlängerte Lenvatinib das progressionsfreie Überleben auf bemerkenswerte 18,3 Monate im Interventionsarm im Vergleich zu 3,6 Monate im Placeboarm (Schlumberger et al., 2015). Nebenwirkungen traten bei 97,3% der mit Lenvatinib behandelten Studienteilnehmer auf. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Hypertonie, Diarrhoe, Müdigkeit, Appetitverlust, Gewichtsabnahme und Übelkeit. Zu den relevantesten, wenn auch selten aufgetretenen Nebenwirkungen gehörten Proteinurie, Nierenversagen, thromboembolische Ereignisse, Leberversagen, gastrointestinale Fisteln sowie eine Verlängerung der QT-Zeit (Schlumberger et al., 2015). Von insgesamt 20 Todesfällen bei 261 Patienten im Interventionsarm während des Studienzeitraums von 14 Monaten werden 6 Todesfälle auf die Behandlung mit Lenvatinib zurückgeführt (Schlumberger et al., 2015). Eine Subanalyse auf Basis der Daten der SELECT-Studie zeigte eine erhöhte Ansprechrate, eine längere Zeit bis eine Dosisreduktion aufgrund von Nebenwirkungen nötig wurde und einen geringeren Anteil an schweren Nebenwirkungen bei Patienten in der Altersgruppe ≤ 65 Jahren im Vergleich zu denen in der Altersgruppe > 65 Jahre (Brose, Worden, Newbold, Guo, & Hurria, 2017). Die Zulassung zur Therapie des fortgeschrittenen radioiodrefraktären differenzierten Schilddrüsenkarzinoms in Europa erfolgte im Mai 2015 (Spitzberg, 2016).

Ein neuer Ansatz nutzt die Erkenntnis, dass eine Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges eine Schlüsselrolle beim Verlust der Natrium-Iodid-Symporter-vermittelten Radioiodspeicherung und damit in der Entwicklung radioiodrefraktärer Verläufe spielt (Riesco-Eizaguirre et al., 2009). Dies ist die Grundlage zur Entwicklung des MEK1/2-Inhibitors Selumetinib, der die MAPK-Aktivierung hemmt und somit die Natrium-Iodid-Symporter-vermittelte Radioiodspeicherung wiederherstellt (Ho et al., 2013). Auf diesem Wege werden radioiodrefraktäre differenzierte Schilddrüsenkarzinome für eine Radioiodtherapie resensibilisiert.

Bisher ist die Datenlage begrenzt. Erste Studien tendieren jedoch dazu, den VEGFR-Kinase-Inhibitoren gegenüber den MEK-Kinase-Inhibitoren den Vorzug zu geben (Haugen et al., 2016).

1.3 Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen)

Bereits erfolgreich in anderen Bereichen der Krebstherapie angewandt, kommt den chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) eine stetig steigende Aufmerksamkeit zu. Es handelt sich hierbei um eine adoptive Immuntherapie. Dem Tumorpatienten werden T-Zellen entnommen, die anschließend in vitro um einen chimären Antigenrezeptor genetisch modifiziert werden. Dabei werden sie im Sinne einer gezielten Therapie mit der Spezifität gegen ein Tumorantigen auf der Tumorzelloberfläche ausgestattet. Danach werden die CAR-modifizierten T-Zellen wieder dem Kreislaufsystem des Patienten zugeführt, wo sie eigenständig ihr Zieltumorantigen aufsuchen und vor Ort ihre Zytotoxizität entfalten.

Die Idee zu CAR-T-Zellen entstand in den 1980er Jahren und die ersten CAR-T-Zellen wurden 1989 hergestellt (Gross, Waks, & Eshhar, 1989). Das erste Mal erfolgreich angewendet wurden CAR-T-Zellen im Jahr 2011 gegen das Antigen CD19 in einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), bei dem eine komplette Remission erreicht werden konnte (Porter, Levine, Kalos, Bagg, & June, 2011). Seitdem wurden weltweit beinahe 200 kli-

nische Studien begonnen, die CAR-T-Zellen gegen Tumore unterschiedlichster Entität einsetzen. Die größten Erfolge erzielten CAR-T-Zellen bisher in hämatologischen malignen Erkrankungen, wie in B-Zell-Malignitäten mit anti-CD19 CAR-T-Zellen oder im Multiplen Myelom mit anti-BCMA CAR-T-Zellen (Perez-Amill, Marzal, Urbano-Ispizua, Juan, & Martin-Antonio, 2018). Im August 2018 erfolgte die Kommerzialisierung als pharmakologisches Produkt mit dem Präparat Kymriah® von Novartis (anti-CD19 CAR-T-Zellen), welches durch die Europäische Kommission zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) zugelassen wurde (Jung, 2018).

Auch solide Tumoren sollen zukünftig Ziel von CAR-T-Zellen sein. Derzeit befinden sich zahlreiche klinische Studien in der Durchführung. Erste Ergebnisse gibt es bereits bei anti-GD2 CAR-T-Zellen gegen Neuroblastome, anti-HER2 CAR-T-Zellen gegen Mammakarzinome und Glioblastome sowie anti-IL-13R α 2 CAR-T-Zellen ebenfalls gegen Glioblastome (Perez-Amill et al., 2018). Jedoch sehen wir uns in soliden Tumoren noch vor Herausforderungen wie einer ausgeprägten Tumorzellheterogenität, schlechtem Ansprechen und einer hohen Toxizität gestellt, ehe CAR-T-Zellen Einzug in den klinischen Alltag halten können (Perez-Amill et al., 2018).

1.3.1 Unterschiede zwischen T-Zellen und CAR-T-Zellen

CAR-T-Zellen verhalten sich in vielerlei Hinsicht abweichend von ihren Vorläufern, den unmodifizierten T-Zellen. Die beiden entscheidenden Unterschiede zwischen T-Zellen und CAR-T-Zellen sind die Abhängigkeit vom Major Histocompatibility Complex I (MHC-I) und die Abhängigkeit von der Stoffklasse des Zielantigens.

T-Zellen sind bei der Erkennung ihrer Zielantigene darauf angewiesen, dass diese in Form von Peptiden durch den MHC-I der Zielzelle präsentiert werden (T. S. Park, Rosenberg, & Morgan, 2011). Ist dies nicht der Fall, verbleibt die Zielzelle unsichtbar für die T-Zellen. Tumorzellen nutzen diese Schwachstelle

der MHC-I-Abhängigkeit aus, um von der körpereigenen Immunabwehr unerkannt zu bleiben. So können Tumorzellen durch die Herabregulierung oder Modulation ihrer MHC-I der T-Zell-Toxizität entkommen. Dementgegen sind CAR-T-Zellen dazu fähig, ihre Zielantigene unmittelbar durch die CAR-Komponente zu erkennen. Der Erkennungsmechanismus erfolgt unabhängig von MHC-I und sonstigen Mediatoren (Abken, 2015). Folglich greifen CAR-T-Zellen auch solche Zellen an, die aufgrund der MHC-I-Abhängigkeit unmodifizierten körpereigenen T-Zellen verborgen geblieben wären (Essand & Loskog, 2013; Lipowska-Bhalla, Gilham, Hawkins, & Rothwell, 2012; T. S. Park et al., 2011).

Ein weiterer bedeutsamer Unterschied ist, dass der T-Zell-Rezeptor der T-Zellen auf die Erkennung von Proteinen beschränkt ist. Alle anderen Stoffklassen sind ihm unkenntlich. Dem T-Zell-Rezeptor der T-Zellen entspricht die CAR-Komponente der CAR-T-Zellen. Diese ist nicht auf die Stoffklasse der Proteine beschränkt, sondern dazu in der Lage auch Kohlenhydrate und Lipide zu erkennen. Die einzige Voraussetzung als Zielstruktur für CAR-T-Zellen dienen zu können, ist das Vorkommen der Zielstruktur auf der Oberfläche der Zielzelle (Abken, 2015; T. S. Park et al., 2011). Hieraus ergibt sich auf der Kehrseite ein Vorteil, den unmodifizierte T-Zellen gegenüber CAR-T-Zellen besitzen: T-Zellen vermögen neben auf der Zelloberfläche befindliche auch intrazelluläre Proteine zu erkennen, die im Proteasom zu Peptiden gespalten und durch membranständige MHC-I präsentiert werden (T. S. Park et al., 2011).

1.3.2 Grundlegende Struktur eines chimären Antigenrezeptors (CAR)

Ein chimärer Antigenrezeptor (CAR) besteht aus drei Komponenten: einer Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer Endodomäne (Abbildung 1) (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

Die Ektodomäne setzt sich zusammen aus einem antigenbindenden Anteil und einem Spacer. Der antigenbindende Anteil wird durch das Single Chain Fragment Variable (scFv) gebildet (Abbildung 1). Dieses besteht aus der variablen schweren (V_H) und der variablen leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Anti-

körpers. Der verwendete Antikörper bestimmt die CAR-T-Zell-Spezifität und ist frei wählbar. Zumeist werden humanisierte murine monoklonale Antikörper verwendet. Die Bindung der Zielstruktur erfolgt unmittelbar über die scFv-Komponente, unabhängig von MHC-I-Molekülen. Die Spezifität und Affinität ist vergleichbar mit der des ursprünglichen, gewählten monoklonalen Antikörpers, aus dem die scFv isoliert wurde (Lipowska-Bhalla et al., 2012). Durch die Bindung des spezifischen Antigens an das scFv wird das erste Signal der T-Zell-Aktivierung ausgelöst. Der Spacer dient als Bindeglied zwischen dem antigenbindenden Anteil und der Transmembrandomäne. Er wird mit einer hohen räumlichen Flexibilität ausgestattet, wodurch die Orientierung des antigenbindenden scFv in die verschiedensten Richtungen ermöglicht wird. Das wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass das scFv sein spezifisches Antigen findet (Lipowska-Bhalla et al., 2012). Als Spacer bieten sich aufgrund der hohen Flexibilität und Stabilität Mitglieder der Superfamilie der Immunglobuline an. Die Hinge-Region von IgG1 ist die einfachste Form eines Spacers und kompatibel für die meisten CAR. Alternativ können ebenfalls CD28, die TCR- β -Kette, CD8 α oder NKG2D herangezogen werden (Lipowska-Bhalla et al., 2012; Zhang, Liu, Zhong, & Zhang, 2017).

Die Transmembrandomäne dient der Stabilität des Rezeptors und der Signaltransduktion des ersten Signals der CAR-vermittelten T-Zell-Aktivierung. In den meisten Fällen wird die CD3 ζ -Kette des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes verwendet (Abbildung 1). Weitere Möglichkeiten sind CD28, CD8, CD4 oder Fc ϵ R1y (Lipowska-Bhalla et al., 2012; Zhang et al., 2017).

Die Endodomäne kombiniert die intrazelluläre Signaldomäne der CD3 ζ -Kette mit weiteren Signaldomänen in Form von kostimulatorischen Molekülen. Mit Hilfe der kostimulatorischen Moleküle wird das zweite Signal der T-Zell-Aktivierung ausgelöst, sodass die CAR-T-Zelle nun ihre vollständige Effektorfunktion und damit T-Zell-Toxizität entfalten kann. Ohne das zweite Signal gehen die CAR-T-Zellen aufgrund des Mangels an überlebensfördernden extrinsischen Signalen in die Apoptose über (Lipowska-Bhalla et al., 2012; Rathmell, Vander Heiden, Harris, Frauwirth, & Thompson, 2000).

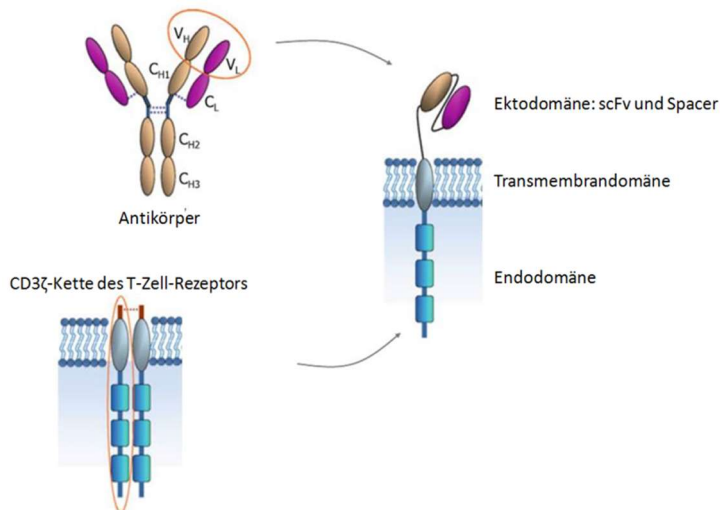


Abbildung 1 • Zusammensetzung eines chimären Antigenrezeptors (CAR) (Lipowska-Bhalla et al., 2012)

1.3.3 Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) als Zielantigen auf differenzieren Schilddrüsenkarzinomzellen

Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) ist der größte unter den G-Proteingekoppelten Hormonrezeptoren. Der N-Terminus des TSHR ist zur Außenseite der Zelle orientiert. Er setzt sich aus zwei Untereinheiten, der A- und der B-Untereinheit, zusammen, die über ein Bindeglied (Cleaved region) miteinander verbunden sind (Abbildung 2). Die A-Untereinheit entspricht der Ektodomäne, die allein beinahe die Hälfte der gesamten Masse des Rezeptors umfasst und neun leucinreiche Repeats (LRR) enthält. Die LRR dienen der Thyreotropin-Bindung. Die B-Untereinheit besteht aus sieben Transmembrandomänen (TMD) (Davies, Ando, Lin, Tomer, & Latif, 2005).

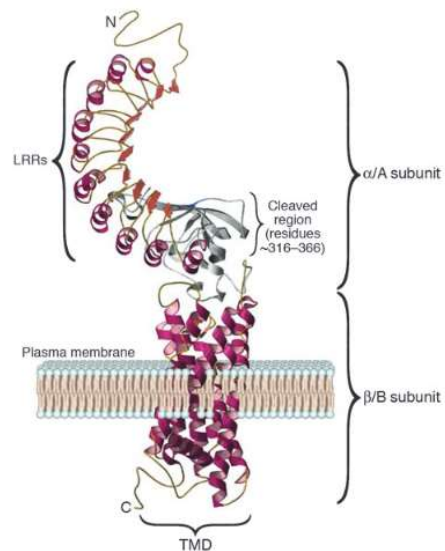


Abbildung 2 • Struktur des Thyreotropin-Rezeptors (TSHR) (Davies et al., 2005)

Der TSHR wird sowohl auf benignen als auch auf malignen Thyreozyten exprimiert und stellt ein geeignetes Antigen dar, um als Zielstruktur für CAR-T-Zellen gegen das differenzierte Schilddrüsenkarzinom zu dienen (Rowe et al., 2017).

Die Wahl des Tumorantigens ist ein äußerst bedeutsamer Faktor für den klinischen Erfolg einer CAR-T-Zell-Therapie. CAR-T-Zellen unterscheiden nicht zwischen gesunden und Tumorzellen. Alle Zellen, die das CAR-spezifische Tumorantigen auf ihrer Oberfläche tragen, werden von den CAR-T-Zellen angegriffen. So kann es zu einer ungewünschten Toxizität gegen gesunde Zellen kommen, die das Zielantigen tragen (Hartmann, Schussler-Lenz, Bondanza, & Buchholz, 2017).

Der Thyreotropin-Rezeptor ist nicht spezifisch für die Follikelepithelzellen des Schilddrüsengewebes. Zu den extrathyreoidalen Lokalisationen zählen unter anderem retroorbital (Bahn et al., 1998) und prätibial (Daumerie, Ludgate, Costagliola, & Many, 2002) gelegene Präadipozyten bei Morbus-Basedow-Patienten, die maßgeblich am Knochenumbau beteiligten Osteoblasten und Osteoklasten (Abe et al., 2003), Erythrozyten (Balzan et al., 2007) und Endothelzellen (Donnini, Ambesi-Impiombato, & Curcio, 2003).

1.3.4 Aufbau des anti-TSHR CAR

Die Ektodomäne des anti-TSHR CARs besteht aus dem Single Chain Fragment Variable (scFv) des monoklonalen, murinen anti-TSHR Antikörpers 3BD10 (Abbildungen 3 und 4). Dieser bindet an die leucinreichen Repeats (LRR) der A-Untereinheit des Thyreotropin-Rezeptors (Chen et al., 2015).



Abbildung 3 • Primäre Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Kette des murinen anti-TSHR Antikörpers 3BD10 (Chen et al., 2015).

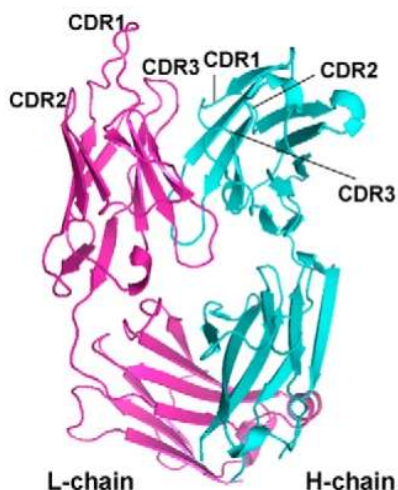


Abbildung 4 • Dreidimensionale Struktur des 3BD10 Fab (Fragment antigen binding). Blau: CDR (Complementarity-Determining Region) in der schweren Kette. Rot: CDR in der leichten Kette (Chen et al., 2015).

Als Transmembrandomäne wurde die CD3 ζ -Kette des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes gewählt. Diese kann durch den endogenen nativen T-Zell-Rezeptor stimuliert werden und führt dadurch zu einer erhöhten Zytokinproduktion mit konsekutiv verbesserter CAR-T-Zell-Aktivierung (Bridgeman et al., 2010). Die größte Stabilität zeigt allerdings eine CD28-Transmembrandomäne (Zhang et al., 2017).

Die Endodomäne enthält die kostimulatorischen Moleküle CD28, 4-1BB und CD27. CD28 ist der bedeutsamste kostimulatorische Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen. Er dient der Bindung von CD80 und CD86, wodurch das zweite Signal der T-Zell-Aktivierung ausgelöst wird (Boesteanu & Katsikis, 2009). Dadurch reguliert er maßgeblich die T-Zell-Proliferation, -Persistenz, sowie -Effektorfunktion (Gmyrek, Pingel, Choi, & Green, 2017). Außerdem bewirkt die durch CD28 ausgelöste Kostimulation die Freisetzung des Interleukins IL-2, welches einen starken, fördernden Einfluss auf die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung zu Effektor- und Memory-T-Zellen nimmt (Bachmann & Oxenius, 2007). 4-1BB wird durch die T-Zell-Aktivierung, unter anderem durch IL-2, induziert und potenziert die T-Zell-Immunantwort. Es fördert die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und generiert große Mengen des Interferons IFN- γ (Vinay & Kwon, 2014). IFN- γ wiederum fungiert als Regulator von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen mit Förderung deren Expansion und Differenzierung zu Memory-T-Zellen (Tewari, Nakayama, & Suresh, 2007). CD27 unterstützt die antigenspezifische Expansion naiver T-Zellen. Es steigert die Generation und Langzeiterhaltung der T-Zell-Immunität (Hendriks et al., 2000).

Die Kombination all dieser Komponenten erzielt eine autarke, hohe und prolongierte Zytokinproduktion, die in einer suffizienten CAR-T-Zell-Aktivierung, -Proliferation, -Persistenz und -Effektorfunktion resultiert. Darüber hinaus wird die Resistenz von CAR-T-Zellen gegenüber dem Abbau durch regulatorische T-Zellen gesteigert. Infolge der starken kostimulatorischen Reize bilden sich Memory-CAR-T-Zellen. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass CAR-T-Zellen im Falle eines Rezidivs reaktiviert werden und erneut ihre zytotoxische Funktion ausüben können (Buchholz, Hartmann, Schüßler-Lenz, & Keller-Stanislawski, 2018; Zhang et al., 2017).

Bei all den Hoffnungen bergen CAR-T-Zellen jedoch auch potentiell letale Gefahren. Aus diesem Grunde wurde ein Suizidgen in Form einer induzierbaren Caspase 9 als „Sicherheitsschalter“ in die Endodomäne des CARs inkorporiert, in der Absicht mehr Kontrolle und Sicherheit in der Anwendung von CAR-T-Zellen zu erlangen (siehe „Inkorporation eines Caspase-9-Suizidgens“, S. 23) (Kershaw, Westwood, & Darcy, 2013).

1.3.5 Gefahren durch CAR-T-Zellen in vivo

Wenn auch CAR-T-Zellen große Hoffnungen in der Therapie von Krebserkrankungen wecken, darf darüber ihr gefährliches Nebenwirkungsprofil nicht vergessen werden.

Bei einer Vielzahl der Patienten wurden neurotoxische Komplikationen beobachtet. So kam es unter anderem zu Enzephalopathie, Kopfschmerzen, Aphasie und Delirium. In einzelnen Fällen wurde von Hirnödemen mit tödlichem Ausgang berichtet (Buchholz et al., 2018).

Eine weitere, potentiell lebensbedrohliche Gefahr ist ein starker Aktivierungsreiz auf das menschliche Immunsystem. Dabei kommt es zu einer ungehemmten, massiven Freisetzung von Zytokinen – dem sogenannten „Zytokinsturm“ (Kershaw et al., 2013). Die Folge ist eine unkontrollierte, systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere des Interleukins IL-6. Die Symptome umfassen hohes Fieber, Fatigue, Übelkeit und einen Schock mit Tachykardie und Hypotonie (Hartmann et al., 2017). Zeigt ein scFv eine sehr hohe Affinität für ihr spezifisches Antigen, liegt im Vergleich zu niedrigen Affinitäten ein höheres Risiko für die Auslösung eines Zytokinsturms vor (Lipowska-Bhalla et al., 2012). Auf der Gegenseite darf die Affinität nicht zu gering gehalten werden, da eine gewisse Schwelle an Affinität die Voraussetzung für die CAR-T-Zell-Bindung an das Zielantigen ist (Essand & Loskog, 2013; Kershaw et al., 2013).

In den meisten Fällen wird der Zytokinsturm durch die Gabe von Tocilizumab, einem Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, und/oder Kortikosteroide beherrscht (Buchholz et al., 2018, Hartmann, 2017 #90). Als Folge kann eine Leukopenie resultieren. Demgegenüber wäre eine selektive Elimination der auslösenden CAR-T-Zellen aus dem Körpersystem vorzuziehen. Aus diesem Grunde berücksichtigen die neuesten Entwicklungsstrategien bei der Komposition der CAR-Komponente ein inkorporiertes Suizidgen, das durch externe Stimulation jederzeit aktiviert werden kann und die applizierten CAR-T-Zellen selektiv in die Apoptose führt (siehe „Inkorporation eines Caspase-9-Suizidgens“, S. 23).

1.3.6 Inkorporation eines Caspase-9-Suizidgens

Wegen der potentiell lebensbedrohlichen Gefahren im klinischen Einsatz von CAR-T-Zellen wird ein Suizidgen in das anti-TSHR CAR inkorporiert. Dieses fungiert als „Sicherheitsschalter“ in Form einer induzierbaren Caspase 9 (Straathof et al., 2005). Wenn das Patientenwohl durch die applizierten CAR-T-Zellen gefährdet wird, wird ein Small Molecule Dimerizer wie beispielsweise AP1903 oder Analoga verabreicht (Iulucci et al., 2001), der 99% der CAR-T-Zellen in die Apoptose führt (Straathof et al., 2005). Schon eine einmalige Dosis von 10 nM reicht aus. Die Darreichung des Small Molecule Dimerizers hat neben der selektiven Elimination der CAR-T-Zellen keinen weiteren Effekt, sodass der Patient keinem weiteren Risiko ausgesetzt wird. Das Caspase-9-Suizidgen besteht aus menschlichen Genen und weist dadurch ein geringes immunogenes Risiko auf (Straathof et al., 2005). Mithilfe dieser Strategie werden selbst die CAR-T-Zellen eliminiert, die im Falle einer malignen Transformation als Schutz vor der Apoptose vermehrt antiapoptotische Moleküle exprimieren (Straathof et al., 2005). Die hohe Sensitivität der Caspase-9-tragenden CAR-T-Zellen gegenüber dem Small Molecule Dimerizer ist in vivo und in vitro etwa gleich hoch (Straathof et al., 2005).

1.4 Definition der Zielsetzung

Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) haben bereits vielversprechende Ergebnisse in der Tumorthherapie erzielt. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung sind folgende Eigenschaften:

- CAR-T-Zellen erkennen ihr zugewiesenes tumorspezifisches Antigen.
- Durch die Bindung der CAR-T-Zellen an das Zielantigen wird das erste Signal der T-Zell-Aktivierung ausgelöst.
- Die kostimulatorischen Moleküle der Endodomäne des CARs lösen das zweite Signal der T-Zell-Aktivierung aus.
- Die CAR-T-Zell-Aktivierung resultiert in einer Zytotoxizität gegen die Tumorzellen.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob CAR-T-Zellen auch Potential in der Therapie der differenzierten Schilddrüsenkarzinome bergen. Das zu Grunde liegende tumorspezifische Antigen ist der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR). Folgende Hypothesen werden geprüft:

- Es gelingt die Entwicklung von CAR-T-Zellen, die den TSHR erkennen (anti-TSHR CAR-T-Zellen).
- Durch die Bindung der anti-TSHR CAR-T-Zellen an den TSHR wird das erste Signal der T-Zell-Aktivierung ausgelöst.
- Die kostimulatorischen Moleküle des anti-TSHR-CARs lösen das zweite Signal der T-Zell-Aktivierung aus.
- Die anti-TSHR CAR-T-Zell-Aktivierung resultiert in der Elimination von Schilddrüsenzellen, inklusive differenzierter Schilddrüsenkarzinomzellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Vorbereitungen für die Zytotoxizitätsanalysen

2.1.1 Zellkultur des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms

In dieser Arbeit werden die zwei Zelllinien K-1 und FTC-133 von Health Protection Agency (HPA) Culture Collection® verwendet, erworben bei Sigma Aldrich® (Sigma Aldrich).

Die Zelllinie K-1 enthält adhärente humane primäre papilläre Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Zellkultivierung erfolgt in Zellkulturflaschen der Größe T25. Das Nährmedium enthält DMEM : Ham's F12 : MCDB 105 (2:1:1) + 2 mM Glutamin + 10% Foetal Bovine Serum (FBS). Sobald die Zellkultur zu etwa 80% konfluent ist wird sie im Verhältnis 1:3 bis 1:10 subkultiviert (Sigma Aldrich).

Die Zelllinie FTC-133 besteht aus adhärenenten humanen follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen, entnommen aus einer Lymphknotenmetastase. Das Nährmedium enthält DMEM : Ham's F12 (1:1) + 2 mM Glutamin + 10% Foetal Bovine Serum (FBS). Das Subkultivierungsverhältnis der zu etwa 80% konfluenten Zellkultur beträgt 1:3 bis 1:10 (Sigma Aldrich).

Die Subkultivierung beider Zelllinien erfolgt auf dieselbe Weise. Zunächst wird das Kulturmedium in den Zellkulturflaschen verworfen. Danach werden die Zellen mit 3-5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der adhärenenten Oberfläche innerhalb der Zellkulturflasche erfolgt durch 3 ml Trypsin und einem Zellschaber. Anschließend werden 3 ml Kulturmedium hinzugefügt, sodass Trypsin durch die FBS-Komponente inaktiviert wird. Der gewünschte Anteil an Zellen kann nun in eine neue T25-Zellkulturflasche überführt werden. Das angestrebte Subkultivierungsverhältnis wird durch eine Verdünnung mit dem jeweiligen Nährmedium erreicht. Die Bedingungen des Brutkastens betragen 5% CO₂ und 37 °C.

2.1.2 Markierung der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen mit Green Fluorescent Protein (GFP)

Die differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen der Zelllinien K-1 und FTC-133 werden mit Green Fluorescent Protein (GFP) markiert, um den Zelluntergang optisch leichter quantifizieren zu können. Die Transduktion mit GFP wird unmittelbar nach der Subkultivierung der K-1- und FTC-133-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70-90% in je ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. Die GFP-Transduktion erfolgt durch das Hinzufügen von GFP-exprimierenden Lentivirusvektoren in die K-1- beziehungsweise FTC-133-Zellkulturen. Darauf folgt eine Inkubation von 24 Stunden im Brustkasten bei 5% CO₂ und 37 °C. Am Folgetag wird das virusenthaltende Kulturmedium durch frisches ersetzt und die GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft.

2.1.3 Nachweis des Thyreotropin-Rezeptors in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133

Die Anwesenheit des Thyreotropin-Rezeptors (TSHR) auf der Zelloberfläche der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133 ist eine Bedingung dafür, dass anti-TSHR CAR-T-Zellen die differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen erkennen. Zur Detektion des Thyreotropin-Rezeptors in den Zelllinien K-1 und FTC-133 werden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt:

1. Immunfluoreszenzfärbung
2. Western Blot

2.1.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133 in 12-Well-Zellkulturplatten auf Deckgläsern kultiviert. Von den zwölf Wells werden pro Zelllinie je vier Wells mit K-1- beziehungsweise FTC-133-Zellen versehen. Es wird abgewartet bis die Zellen zu etwa 80% konfluent sind.

Folgende Reagenzien werden vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet:

- 4% Paraformaldehyd: verdünnt in Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Blockierungspuffer: 1% Bovine Serum Albumine (BSA) + 10% Ziegen serum + 0,3 M Glycin in 0,1% PBS
- Primärer Antikörper: muriner anti-TSHR-Antikörper ab6044 von Abcam® verdünnt in Blockierungspuffer zu einer Konzentration von 1 µg/ml
- Sekundärer Antikörper mit Rhodamin und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI): verdünnt in Blockierungspuffer
 - o Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) A28175 von ThermoFisher Scientific® in einem Verhältnis von 1:1000
 - o Rhodamin in einem Verhältnis von 1:50
 - o DAPI in einem Verhältnis von 1:1000

Im ersten Schritt wird das Kulturmedium aus den Wells entfernt und die Zellen einmalig mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Danach folgt die Fixierung der Zellen in 500 µl 4% Paraformaldehyd über eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden die fixierten Zellen insgesamt dreimal für je 10 Minuten mit 500 µl PBS gewaschen.

Als nächstes werden die Kulturen mittels 500 µl Blockierungspuffer, dem 0,1% Tween hinzugefügt wurde, geblockt und permeabilisiert. Dies geschieht über 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach werden die fixierten, geblockten und permeabilisierten Zellen einmal mit 500 µl Blockierungspuffer gewaschen.

Von den vier Wells mit K-1- beziehungsweise FTC-133-Zellen werden je zwei Wells mit dem primären murinen anti-TSHR Antikörper (ab6044 von Abcam®) behandelt. Die verbliebenen zwei Wells bleiben als negative Kontrolle frei von einem primären Antikörper. Die Inkubationszeit beträgt 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Nachdem der primäre anti-TSHR Antikörper sein Zielantigen binden konnte, wird der Überschuss an nicht gebundenem primärem Antikörper in drei Waschgängen mit je 500 µl Blockierungspuffer für je 15 Minuten entfernt. Danach wird der sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) A28175 von ThermoFisher Scientific® mitsamt Rhodamin zur Färbung des Zytoskeletts und DAPI zur Färbung der Zellkerne mit den vorbehandelten K-1- beziehungsweise FTC-133-Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wird abgeschlossen durch einen letzten dreifachen Waschschrift mit je 500 µl PBS für je 15 Minuten.

Die behandelten Deckgläser in den Wells werden zur Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der zelltragenden Seite nach unten auf Objektträger überführt, die zuvor mit Fluoromount G™ präpariert wurden. Fluoromount G™ dient der Versiegelung und damit Konservierung der Immunfluoreszenzfärbung.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt dreimal wiederholt.

2.1.3.2 Western Blot

Western Blotting beschreibt die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Der Western Blot mit den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133 wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Folgende Reagenzien werden vor Beginn des Western Blots vorbereitet:

- Radioimmunoprecipitation Assay Pufferlösung (RIPA Buffer): 50 mM TrisHCl pH 7,4 + 150 mM NaCl + 2 mM EDTA + 1% NP-40 + 0,1% SDS, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter
- 10x Running Buffer: 30,3 g Tris Base + 144 g Glycin + 10 g SDS, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter
- Transfer Buffer: 6 g Tris Base + 28,8 g Glycin + 400 ml Methanol, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 2 Liter
- Ponceaufärbemittel: 0,033 g Ponceau S + 0,3 ml glaziale Essigsäure, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 30 ml
- TBST-Puffer: 121,1 g Tris Base + 87,6 g Natriumchlorid + 5 ml Tween20, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter

Am ersten Tag wird das Protein aus den K-1- und FTC-133-Zellen extrahiert. Dazu werden Zellpellets der kultivierten K-1- und FTC-133-Zellen angefertigt. Nach dem Ablösen der Zellen in den T25-Zellkulturflaschen durch Trypsin und Inaktivierung durch das jeweilige Nährmedium werden die Zellen in ein zentrifugengeeignetes Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die erhaltenen Zellpellets aus K-1- beziehungsweise FTC-133-Zellen werden mit 100 µl Radioimmunoprecipitation Assay Pufferlösung (RIPA Buffer) und 2 µl eines Protease-Inhibitors gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis wird dieses Gemisch bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene extrahierte Protein befindet sich nun in der überstehenden Flüssigkeit und wird verwahrt, während der sedimentierte Zelldebris verworfen wird.

Die Konzentration des gewonnenen extrahierten Proteins aus den K-1- und FTC-133-Zellen wird mithilfe einer Albumin-Standard-Kurve abgelesen. Dazu wird eine Verdünnungsreihe von Bovine Serum Albumin (BSA) mit RIPA Buffer auf ein Volumen von je 30 µl hergestellt: 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml. Jede Verdünnungsstufe wird in eine 96-Well-Zellkulturplatte gefüllt und mit 170 µl Bradford Reagent gemischt. Nachdem 2 Minuten zur Entwicklung der blauen Farbe vergangen sind, wird jede Verdünnungsstufe zu einer Wellenlänge von 595 nm im Luminometer ausgelesen. Es

entsteht annäherungsweise ein Graph zur linearen Funktion $f(x) = mx + n$ mit x = Konzentration in mg/ml und $f(x)$ = Absorption in nm. Danach wird das extrahierte Protein mit destilliertem Wasser verdünnt, um möglichst viel extrahiertes Protein zu sparen, und dessen Absorption gemessen. Anhand der gemessenen Absorption $f(x_{\text{verdünntes Protein}})$ kann die Funktion nach der Konzentration $x_{\text{verdünntes Protein}}$ aufgelöst werden. Zuletzt wird die Konzentration $x_{\text{verdünntes Protein}}$ mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die unverdünnte Proteinkonzentration zu erhalten. Das Protein der K-1- und FTC-133-Zellen wird bis zum nächsten Tag bei -20 °C aufbewahrt.

Der zweite Tag beginnt mit der Vorbereitung der K-1- und FTC-133-Proteinproben für die Gelelektrophorese. Dazu werden je $30\text{ }\mu\text{g}$ Protein mit dem Farbstoff Bromphenolblau und destilliertem Wasser zu $28\text{ }\mu\text{l}$ vermengt. Die Proben werden für 3 Minuten in einem 100 °C Wasserbad erwärmt. Danach ruhen sie für 10 Sekunden auf Eis, bevor sie in die vorgesehenen Taschen des Elektrophoresegels pipettiert werden. Als Elektrophoreseegel dient das vorgefertigte Mini-PROTEAN® TGX™ Gel von Bio-Rad®. In die erste Tasche wird die DNA-Leiter Precision Plus™ WesternC™ von Bio-Rad® als Massenstandard pipettiert. 100 ml $10\times$ Running Buffer werden durch Hinzugabe von 900 ml destilliertem Wasser auf 1 Liter $1\times$ Running Buffer verdünnt. Die Elektrophorese wird in einer mit $1\times$ Running Buffer aufgefüllten Elektrophoresekammer bei 90 V für etwa 2 Stunden durchgeführt.

Nach der Auftrennung des extrahierten Proteins folgt der Transfer auf eine Nitrozellulosetransfermembran. Dazu wird die Transfermembran anodenseitig auf das Gel gelegt. Das Gel und die Transfermembran werden beide mit von Transfer Buffer benässtem Filterpapier belegt, danach mit von Transfer Buffer benässten Schwämmen. Diese Schichtung wird in einer Western-Blot-Klemme zwischen die beiden Elektroden gesetzt und die Kammer mit Transfer Buffer aufgefüllt. Der Proteintransfer auf die Membran wird bei 4 °C und 90 V für etwa 2 Stunden durchgeführt.

Die transferierten Proteine auf der Nitrozellulosetransfermembran werden mit dem vorbereiteten Ponceaufärbemittel bedeckt und durch leichtes Schwenken sichtbar gemacht. Das Ponceaufärbemittel kann zwecks Wiederverwertung

aufgefangen werden. Der Überschuss an Färbemittel wird mittels destillierten Wassers vorsichtig abgespült.

Nach dem Proteintransfer werden die verbliebenen freien Stellen für Proteinbindungen mit 25 ml Blockierungslösung, bestehend aus 5 g Milchpulver aufgelöst in 100 ml TBST-Puffer, blockiert. Dadurch erzeugt die am nächsten Tag folgende Antikörperfärbung keine unerwünschte Färbung. Die proteintragende Transfermembran wird über Nacht bei 4 °C auf einem Wippschüttler bei 35 RPM (Rocks Per Minute) inkubiert. Zum Schutz vor Verdunstung wird das Behältnis mit Parafilm® Verschlussfolie versiegelt.

Am dritten Tag wird die Antikörperfärbung durchgeführt. Als primärer Antikörper wird der murine anti-TSHR Antikörper ab6044 von Abcam® zu einem Verhältnis von 1:2000 mit 5% Trockenmilch in TBST-Puffer verdünnt. Dazu werden 2,5 µl des primären Antikörpers mit 5 ml 5% Trockenmilch in TBST-Puffer vermischt. Der primäre Antikörper in Trockenmilch-TBST-Puffer wird auf die geblockte proteintragende Transfermembran gegeben, sodass er diese vollständig bedeckt, und bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden auf dem Wippschüttler bei 35 RPM inkubiert. Anschließend wird die Transfermembran dreimal mit 10 ml TBST für je 10 Minuten bei 65 RPM auf dem Wippschüttler gewaschen. Als sekundärer Antikörper wird der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper Donkey Anti-Mouse IgG H&L (HRP) ab6820 von Abcam® verwendet. Es werden 1 µl Precision Protein™ Strep Tactin-HRP Conjugate von Bio-Rad® zu einem Verhältnis von 1:10000 und 2 µl sekundärer Antikörper zu einem Verhältnis von 1:5000 in 10 ml 5% Trockenmilch-TBST-Puffer verdünnt und auf die Transfermembran gegeben, sodass sie dieselbe bedecken. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 35 RPM auf dem Wippschüttler. Die Antikörperfärbung wird durch eine letzte dreimalige Waschung der Transfermembran in 10 ml TBST-Puffer für je 10 Minuten bei 65 RPM auf dem Wippschüttler abgeschlossen.

Zur Auslösung der Chemilumineszenzemission wird Immobilon™ Western von Millipore® eingesetzt. Die Transfermembran wird für 2 Minuten in eine Lösung aus 2 ml Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution und 2 ml

Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol Reagent gelegt. Anschließend kann die Chemilumineszenz detektiert werden.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt zweimal wiederholt.

2.1.4 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblutproben

T-Zellen gehören der Gruppe der Leukozyten an und innerhalb dieser Gruppe den peripheren mononukleären Zellen. Neben den Lymphozyten zählen dazu die Monozyten. Die mononukleären Zellen können von den restlichen Anteilen im Vollblut mittels der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll separiert werden, basierend auf der unterschiedlichen Dichte der Vollblutbestandteile. Ficoll ist ein Saccharosepolymer mit einer bekannten Dichte von 1,077 g/ml.

Im ersten Schritt erfolgt die Entnahme einer peripheren Vollblutprobe mit einem 10 ml EDTA-Röhrchen zur Vermeidung der Blutkoagulation. Es folgt eine Verdünnung der Vollblutprobe mit Phosphate Buffered Saline (PBS) in einem Verhältnis von 1:1. Nun wird 2 ml Ficoll in ein zentrifugeneignetes Röhrchen gegeben und mit 4 ml der verdünnten Vollblutprobe überschichtet. Danach wird das Röhrchen bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 900 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind die Bestandteile der Vollblutprobe in verschiedene Phasen separiert (Abbildung 5).

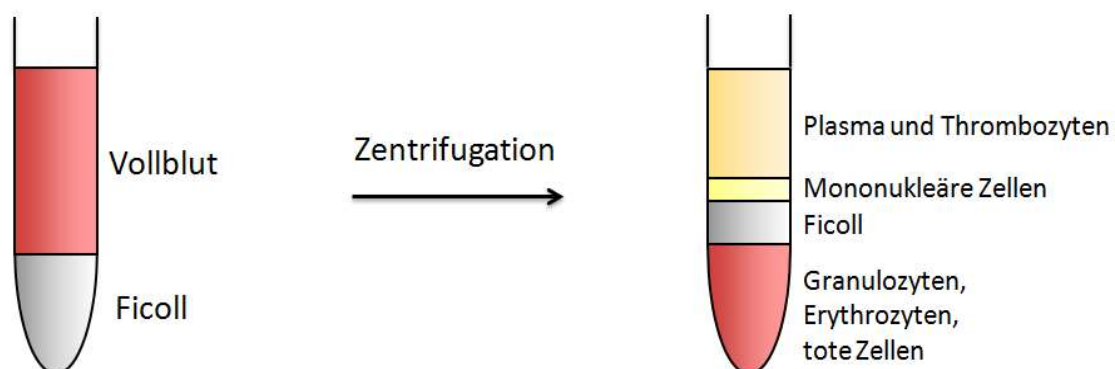


Abbildung 5 • Ficoll-Dichtegradienten-Zellisolation.

Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen passieren die Ficollschicht, während sich die Phase der peripheren mononukleären Zellen direkt oberhalb der Ficollschicht befindet. Thrombozyten sammeln sich aufgrund ihrer geringen Zelldichte im Plasma. Zunächst wird das Plasma samt Thrombozyten mit einer Pipette entfernt. Danach wird allein die Schicht der peripheren mononukleären Zellen, ohne Bestandteile der anderen Phasen, vorsichtig unter Einsatz einer Pipette aufgenommen. Eine Kontamination mit Ficoll ist aufgrund einer zytotoxischen Wirkung zu vermeiden.

2.1.5 Aktivierung der isolierten T-Zellen

Die frisch separierten peripheren mononukleären Zellen werden in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte gegeben, welches das Kulturmedium TexMACS™ von Miltenyi Biotec® enthält. TexMACS™ ist frei von Serum und tierischen Komponenten. Es wurde speziell für die Kultivierung von T-Zellen zur Optimierung der Lebensfähigkeit und Stabilität entwickelt (Saito et al., 2014). Die 6-Well-Zellkulturplatte wird im Brutkasten bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Fraktion der Monozyten bindet an die adhärente Oberfläche innerhalb des Wells der 6-Well-Zellkulturplatte, während die Fraktion der Lymphozyten in Suspension bleibt.

Ruhende T-Zellen sind auf extrazelluläre Signale durch Zytokine oder Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) angewiesen, um einen basalen Metabolismus aufrecht erhalten zu können. Unter Abwesenheit dieser extrazellulären Signale fällt die Kapazität des Glucoseimports unterhalb einer notwendigen Schwelle zur Erhaltung der zellulären Homöostase (Frauwirth & Thompson, 2004). Somit gehen ruhende T-Zellen bei mangelnden trophischen Signalen unter. Aus diesem Grund wird das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) hinzugefügt, welches die isolierten T-Zellen aktiviert. Die dadurch induzierte T-Zell-Proliferation ist abhängig von Monozyten (Ceuppens, Baroja, Lorre, Van Damme, & Billiau, 1988). Nach der T-Zell-Aktivierung werden die Lymphozyten bei 5% CO₂ und 37 °C im Brutkasten inkubiert bis sie zu etwa 80% konfluent sind.

2.1.6 Transduktion der isolierten T-Zellen mit dem anti-TSHR CAR

Die isolierten T-Zellen werden analog zur GFP-Transduktion der Zielzellen (siehe „Markierung der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen mit Green Fluorescent Protein (GFP)“, S. 27) mit dem anti-TSHR CAR mithilfe von lentiviralen Vektoren genmodifiziert. Dazu wird die DNA des CARs in einen lentiviralen Vektor kloniert. Danach werden die isolierten, aktivierten T-Zellen mit dem CAR-tragenden lentiviralen Vektor infiziert. Das Produkt sind anti-TSHR CAR-T-Zellen.

Lentiviren wie das Human-Immundeficiency-Virus-1 (HIV-1) sind im Gegensatz zu Retroviren auch in der Lage, Gene in das Genom einer nicht-teilungsfähigen Zelle zu integrieren. Daher eignen sich lentivirale Vektoren zum Gentransfer in die nicht-teilungsfähigen T-Zellen (Ramezani & Hawley, 2002). Eine Voraussetzung dazu ist die vorherige Aktivierung der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und/oder durch Zytokine (Verhoeyen, Costa, & Cosset, 2009). Der lentivirale Gentransfer zeigt eine stabile Langzeitexpression des CARs in den T-Zellen und ihren Tochterzellen (Essand & Loskog, 2013).

Alle Schritte der Herstellung von anti-TSHR CAR-T-Zellen wurden in Kooperation mit Prof. Ph.D. Lung-Ji Chang (Department of Molecular Genetics & Microbiology, University of Florida) durchgeführt.

2.1.7 Nachweis der Bindung der anti-TSHR CAR-T-Zellen an den Thyreotropin-Rezeptor auf K-1- und FTC-133-Zellen

Die Bindung der anti-TSHR CAR-T-Zellen an den Thyreotropin-Rezeptor auf den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133 wird mittels einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen.

Der Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung folgt dem der Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Thyreotropin-Rezeptors auf K-1- und FTC-133-Zellen (siehe „Immunfluoreszenzfärbung“, S. 28). Der Unterschied liegt in den verwen-

deten primären und sekundären Antikörpern. Als primärer Antikörper dienen in diesem Versuch die zuvor generierten anti-TSHR CAR-T-Zellen. Diese liegen frei suspendiert im Kulturmedium TexMACS™ von Miltenyi Biotec® vor. Die anti-TSHR CAR-T-Zellen werden in einem Verhältnis von 1:4 mit dem Blockierungspuffer verdünnt, sodass für jedes Well der 12-Well-Zellkulturplatte 100 µl anti-TSHR CAR-T-Zellen mit 400 µl Blockierungspuffer vorbereitet werden. Als sekundärer Antikörper, der die gebundenen anti-TSHR CAR-T-Zellen sichtbar macht, werden die fluoreszenzmarkierten Goat anti-Human IgG und IgM von Molecular Probes® ThermoFisher Scientific® in einem Verhältnis von 1:1000 verwendet. Die Inkubation mit den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133 erfolgt bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Die negative Kontrolle bildet ein Ansatz ohne anti-TSHR CAR-T-Zellen.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt zweimal wiederholt.

2.2 Zytotoxizitätsanalysen

2.2.1 Ko-Kultivierung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen und CAR-T-Zellen

Die Versuchsreihen zur Ko-Kultivierung basieren auf zwei Bestandteilen: den Ziel- und den Effektorzellen. Die Zielzellen sind die papillären Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und die follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen FTC-133, die Effektorzellen unmodifizierte und CAR-modifizierte T-Zellen.

Die Zielzellen werden neben einer negativen Kontrolle, die nur aus Zielzellen besteht, drei verschiedenen Ansätzen ausgesetzt:

1. Nur Zielzellen (keine Effektorzellen)
2. Zielzellen + unmodifizierte T-Zellen
3. Zielzellen + unspezifische CAR-T-Zellen (anti-CD19)
4. Zielzellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen

Das verwendete Nährmedium ist TexMACS™ von Miltenyi Biotec®.

Als unmodifizierte T-Zellen werden T-Zellen bezeichnet, die aus dem peripheren Blut isoliert, jedoch keiner genetischen Modifikation unterzogen wurden. Die unspezifischen CAR-T-Zellen tragen ein CAR, dessen Zielantigen nicht auf differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen vorkommt. In den folgenden Versuchen werden unspezifische anti-CD19 CAR-T-Zellen verwendet. Spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen sind gegen den Thyreotropin-Rezeptor auf der Oberfläche differenzierter Schilddrüsenkarzinomzellen wie K-1 und FTC-133 gerichtet.

Zunächst werden die Zellen um den Faktor 5 mit Trypanblau verdünnt, indem 5 μ l Zellen mit 20 μ l Trypanblau vermischt werden. Trypanblau färbt selektiv nur tote Zellen dunkelblau, während vitale Zellen nicht angefärbt werden. Direkt im Anschluss werden die vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter ergibt sich aus dem Ergebnis der Zählung multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 5 und 10^4 . Da Trypanblau zytotoxisch wirkt, muss die Zählung unmittelbar nach der Anfärbung erfolgen, um eine falsch-hohe Anzahl toter Zellen zu vermeiden.

Es werden verschiedene Verhältnisse von Effektorzellen:Zielzellen untersucht, begonnen mit einem niedrigen Verhältnis. Das Verhältnis wird sukzessive gesteigert und die Auswirkungen verglichen. Ziel ist es, das minimale Verhältnis an Effektorzellen:Zielzellen zu ermitteln, bei dem ein effektiver Zelltod der Schilddrüsenkarzinomzellen möglich ist. So wird der beste Kompromiss aus Zytotoxizität und Risikominimierung ermittelt. Jeder Ansatz wird in dreifacher Ausfertigung kultiviert.

2.2.2 Auswertung des Zelltods von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen in den Ko-Kulturen

Der Zelltod der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133 wird auf drei Arten ausgewertet:

1. Reduktion der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Mikroskop
2. Reduktion der GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop
3. Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse

2.2.2.1 Reduktion von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Mikroskop

Die Reduktion von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Mikroskop wird zwischen folgenden Ansätzen verglichen:

1. Nur Zielzellen (keine Effektorzellen)
2. Zielzellen + unmodifizierte T-Zellen
3. Zielzellen + unspezifische CAR-T-Zellen (anti-CD19)
4. Zielzellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen

Der Zelltod von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen zeigt sich als eine Reduktion derselben. Außerdem sind dichte Zellkonglomerate zu beobachten.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt einmal durchgeführt.

2.2.2.2 Reduktion von GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Reduktion von GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wird zwischen folgenden Ansätzen verglichen:

1. Nur Zielzellen (keine Effektorzellen)
2. Zielzellen + unmodifizierte T-Zellen
3. Zielzellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen

Eine Analyse der Zielzellen + unspezifische CAR-T-Zellen (anti-CD19) war aufgrund technischer Probleme nicht möglich.

Der Zelltod von GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen zeigt sich als eine Reduktion derselben. Die optische Einschätzung wird durch die GFP-Markierung erheblich erleichtert.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt einmal durchgeführt.

2.2.2.3 Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse

Mithilfe einer Lumineszenz-Analyse wird die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen (Caspase-Glo 3/7 Assay von Promega®, REF G8092). Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den Cysteinproteasen, die ihr Zielprotein an einer Peptidbindung C-terminal von Aspartat schneiden, woher der Name stammt (Englisch: cysteinyl-aspartate specific protease). Diese Vertreter der Caspase-Familie stehen am Ende des Signalweges, der die Apoptose tierischer Zellen einleitet. Die emittierte Lumineszenz ist proportional zur anwesenden Caspase-3/7-Aktivität und dient somit als Maß der stattgefundenen Zellapoptose in den Ko-Kulturen (Promega, 2018).

Sobald die GFP-markierten K-1- und FTC-133-Zellen zu etwa 80% konfluent sind, werden sie mit den Effektorzellen in Ko-Kultur gebracht. Als erstes wird

das Kulturmedium in den Zellkulturflaschen verworfen. Danach werden die K-1- und FTC-133-Zellen zweimal mit je 3 ml 10 mM EDTA gewaschen. Beim zweiten Mal verbleibt das EDTA in den Zellkulturflaschen. Es wird etwa fünf Minuten abgewartet, um den Zellen Zeit zu geben sich von der haftenden Oberfläche innerhalb der Zellkulturflaschen zu lösen. Zur Ablösung der adhärennten K-1- und FTC-133-Zellen in den T25-Zellkulturflaschen wird EDTA anstelle von Trypsin verwendet, da EDTA schonender für die K-1- und FTC-133-Zellen ist (Iwakuma, Cui, & Chang, 1999). Die Zellen sollen vor der Zytotoxizitätsanalyse möglichst unbeschadet bleiben.

Nach der Ablösung wird je 2 – 5 ml des jeweiligen Kulturmediums zu den K-1- und FTC-133-Zellen gegeben. Es ist darauf zu achten, die Zellen nicht zu stark zu verdünnen, sodass eine Zelldichte von 4×10^4 pro 100 μ l nicht unterschritten wird. Nun werden die K-1- und FTC-133-Zellen wie bereits zuvor beschrieben mit Trypanblau angefärbt. Die vitalen Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer gezählt, um die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter zu ermitteln (siehe „Ko-Kultivierung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen und CAR-T-Zellen“, S. 37). Im weiteren Verlauf werden die Zielzellen allein und in Ko-Kulturen bestehend aus Zielzellen und drei unterschiedlichen Effektorzellen beobachtet. Jeder Ansatz wird in dreifacher Ausfertigung angelegt. Daher werden die Zielzellen K-1 und FTC-133 jeweils in vier Zeilen in je drei Wells und je 4×10^4 vitale Zielzellen pro Well in einer 96-Well-Zellkulturplatte gesät (Abbildung 6). Unter Hinzugabe des jeweiligen Kulturmediums wird jedes Well auf ein Volumen von 100 μ l gebracht. Die 96-Well-Zellkulturplatte wird für 2 Stunden im Brutkasten bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. In dieser Zeit haften die Zielzellen dem Boden der Zellkulturplatte an.

In der Zwischenzeit werden die vitalen Effektorzellen gezählt. Diese sind unmodifizierte T-Zellen, unspezifische CAR-T-Zellen (anti-CD19) und spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen. Dazu wird erneut eine Färbung mit Trypanblau durchgeführt (siehe „Ko-Kultivierung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen und CAR-T-Zellen“, S. 37).

Als nächstes werden die nun adhärennten Zielzellen in der 96-Well-Zellkulturplatte mit den Effektorzellen in Kontakt gebracht. Dazu wird das Kul-

turmedium in den Zielzellkulturen verworfen. Das Verhältnis Effektorzellen:Zielzellen soll für jede Kombination aus Effektor- und Zielzellen 5:1 betragen (siehe „Zelltod von K-1- und FTC-133-Zellen in den Ko-Kulturen“, S. 45). Deshalb wird jedem Well 5 x 4 x 10⁴ vitale Effektorzellen nach dem Schema in Abbildung 6 hinzugefügt. Eine Ausnahme bilden die Wells, die nur Zielzellen tragen sollen. Sie werden nicht mit Effektorzellen versetzt. Jedes Well wird mit TexMACS™ Kulturmedium auf ein Volumen von 250 µl gebracht.

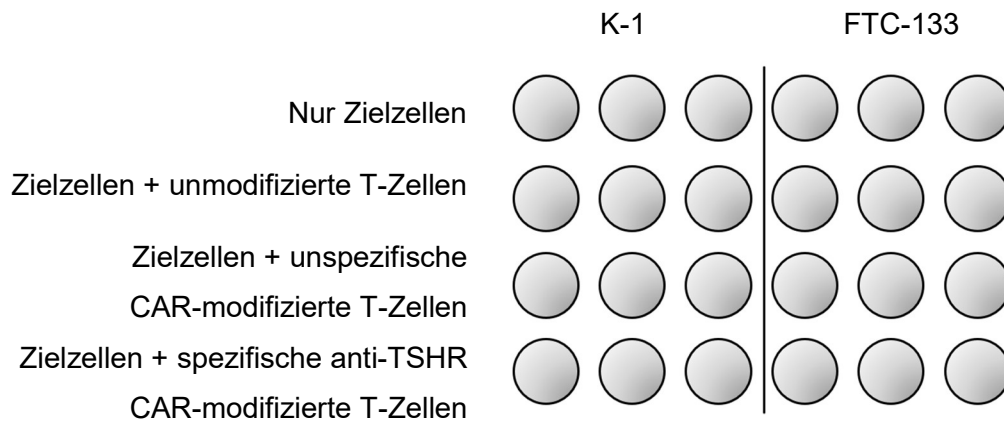


Abbildung 6 • Ko-Kultur der Ziel- und Effektorzellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte als Vorbereitung für eine Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse.

Die 96-Well-Zellkulturplatte wird zur Inkubation in einem Brutkasten bei 5% CO₂ und 37 °C gelagert. In den nächsten Tagen wird die 96-Well-Zellkulturplatte täglich unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Hinweise des Zelltods der Zielzellen kontrolliert. Dieser zeigt sich durch eine sichtbare Reduktion der GFP-markierten K-1- und FTC-133-Zellen in den Ansätzen mit Effektorzellen im Vergleich zu den Ansätzen, die nur Zielzellen enthalten.

Sobald eine Reduktion an GFP-markierten Zielzellen erkennbar wird, kann mit der Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse fortgefahren werden. Diese wird mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay von Promega® durchgeführt. Zu Beginn wird aus jedem Well 175 µl des Überstands verworfen, sodass in jedem Well 75 µl verbleiben. Jedem Well wird 75 µl Caspase Solution hinzugefügt, ohne zu vermischen, um die Zellen nicht zu stören. Danach wird die 96-Well-Zellkulturplatte für 20 Minuten in einer möglichst dunklen Umgebung inkubiert. Die Abschirmung vor Licht kann beispielsweise durch Umhüllung mit Aluminiumfolie er-

reicht werden. Anschließend wird der Inhalt jedes Wells sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren durchmischt, sodass sich jede Zielzelle vom Boden der Zellplatte löst. Danach wird der Inhalt in ein Eppendorf Tube überführt. Abschließend wird die Lumineszenz eines jeden Eppendorf Tubes in einem Luminometer gemessen. Dazu wird die Software GloMax®-20/20 Luminometer von Promega® verwendet.

Dieser Versuch wurde in dieser Form insgesamt einmal durchgeführt.

2.2.3 Statistik

Die Ergebnisse der Caspase-3/7-Lumineszenzmessung werden von der Software GloMax®-20/20 Luminometer von Promega® als Excel-Tabelle von Microsoft® Windows® dargestellt. Zuerst wird die Lumineszenz der Effektorzellen ohne Zielzellen gemessen. Aus den Ergebnissen wird für jeden Ansatz der Mittelwert gebildet (Tabelle 1). Darauf folgen die Messungen der Ko-Kulturen aus Effektorzellen und Zielzellen. Von jedem Ergebnis eines Ansatzes in Ko-Kultur wird die durchschnittliche Lumineszenz der jeweils verwendeten Effektorzellen von der insgesamt gemessenen Lumineszenz abgezogen. Daraus resultiert die Lumineszenz, die allein auf die Apoptose der Schilddrüsenkarzinomzellen zurückzuführen ist. Von den Subtraktionen wird je Ansatz der Mittelwert bestimmt. Darauf wird der Zweistichproben-T-Test für den Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau ist auf $\alpha = 0,05$ festgelegt (Tabellen 2 und 3). Die Daten werden mithilfe des Programmes IBM® SPSS® Statistics 24 graphisch als Boxplots veranschaulicht (Abbildungen 12 und 13).

3 ERGEBNISSE

3.1 Nachweis des Thyreotropin-Rezeptors in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133

3.1.1 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung wird unter Verwendung des primären monoklonalen murinen anti-TSHR Antikörpers der Thyreotropin-Rezeptor auf der Oberfläche der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133 nachgewiesen. Als negative Kontrolle dient ein Ansatz ohne primären Antikörper.

Im Vergleich zur negativen Kontrolle zeigt der Ansatz mit primärem anti-TSHR Antikörper eine deutliche Fluoreszenz (Abbildung 7). Demnach wurde der Thyreotropin-Rezeptor auf der Oberfläche der K-1- und FTC-133-Zellen detektiert.

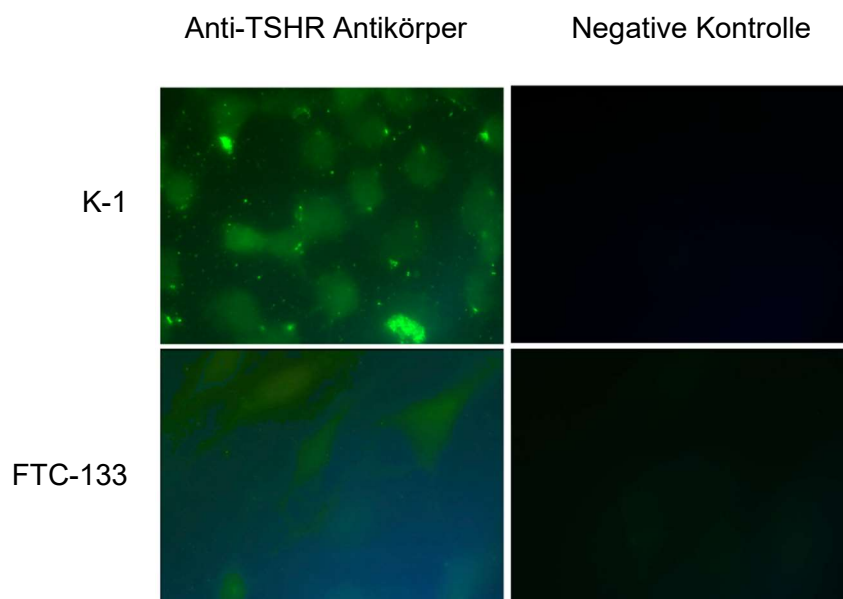


Abbildung 7 • Links: Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen murinen anti-TSHR Antikörper als primären Antikörper. Rechts: Negative Kontrolle ohne primären Antikörper. Oben: K-1 papilläre Schilddrüsenkarzinomzellen. Unten: FTC-133 follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen.

3.1.2 Western Blot

Neben der Immunfluoreszenzfärbung wird die Expression des Thyreotropin-Rezeptors in den K-1- und FTC-133-Zellen mittels Western Blot belegt. Es wurde derselbe monoklonale murine anti-TSHR Antikörper als primärer Antikörper eingesetzt wie in der Immunfluoreszenzfärbung. Es zeigen sich Banden der zu erwartenden Größe des Thyreotropin-Rezeptors von 92 kDa (Abbildung 8). Zudem ist eine Bande zwischen 37 kDa und 50 kDa bei den FTC-133-Zellen sichtbar, welche am ehesten einem Polypeptid entspricht, das in den Analysen von Nichol森 et. al zu monoklonalen Antikörpern und dem Thyreotropin-Rezeptor regelhaft nachzuweisen war (Nicholson et al., 1996).

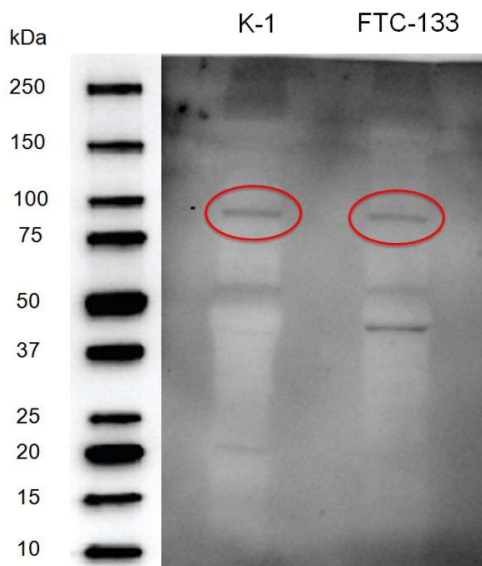


Abbildung 8 • Western Blot mit dem monoklonalen murinen anti-TSHR Antikörper als primären Antikörper. Die roten Kreise markieren die zu erwartende Größe des Thyreotropin-Rezeptors von 92 kDa.

3.2 Anti-TSHR CAR-T-Zellen erkennen K-1- und FTC-133-Zellen

Eine weitere Immunfluoreszenzfärbung beweist die Bindung der generierten anti-TSHR CAR-T-Zellen an den Thyreotropin-Rezeptor der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133. Im Vergleich zur negativen Kontrolle zeigt der Ansatz mit anti-TSHR CAR-T-Zellen eine deutliche Fluoreszenz (Abbildung 9).

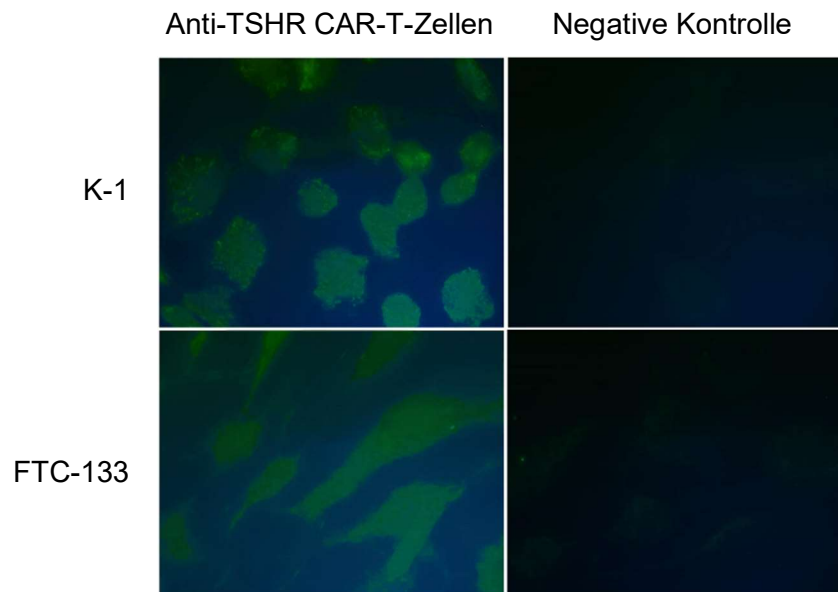


Abbildung 9 • Links: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-TSHR CAR-T-Zellen als primären Antikörper. Rechts: Negative Kontrolle ohne anti-TSHR CAR-T-Zellen. Oben: K-1 papilläre Schilddrüsenkarzinomzellen. Unten: FTC-133 follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen.

3.3 Zelltod von K-1- und FTC-133-Zellen in den Ko-Kulturen

Unter fünf unterschiedlichen Versuchen ergab ein Effektorzellen:Zielzellen-Verhältnis von 5:1 den besten Kompromiss zwischen signifikanter Zytotoxizität und Risikominimierung. Somit werden je Well 4×10^4 Zielzellen (differenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen K-1 und FTC-133) mit $5 \times 4 \times 10^4$ Effektorzellen (unmodifizierte T-Zellen und CAR-T-Zellen) ko-kultiviert.

Der Zelltod der Zielzellen wird auf drei verschiedene Arten nachgewiesen:

1. Reduktion der differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Mikroskop
2. Reduktion der GFP-markierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop
3. Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse

3.3.1 Reduktion von K-1- und FTC-133-Zellen unter dem Mikroskop

Ein deutlicher Zelltod der Zielzellen ist in der Ko-Kultur von Zielzellen und spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen erkennbar. Dieser stellt sich als dichtes, dunkles und gut abgrenzbares Konglomerat neben vitalen Schilddrüsenkarzinomzellen dar. Die zum Vergleich stehenden Ansätze weisen eine geringe Anzahl an untergegangenen Schilddrüsenkarzinomzellen auf (Abbildung 10).

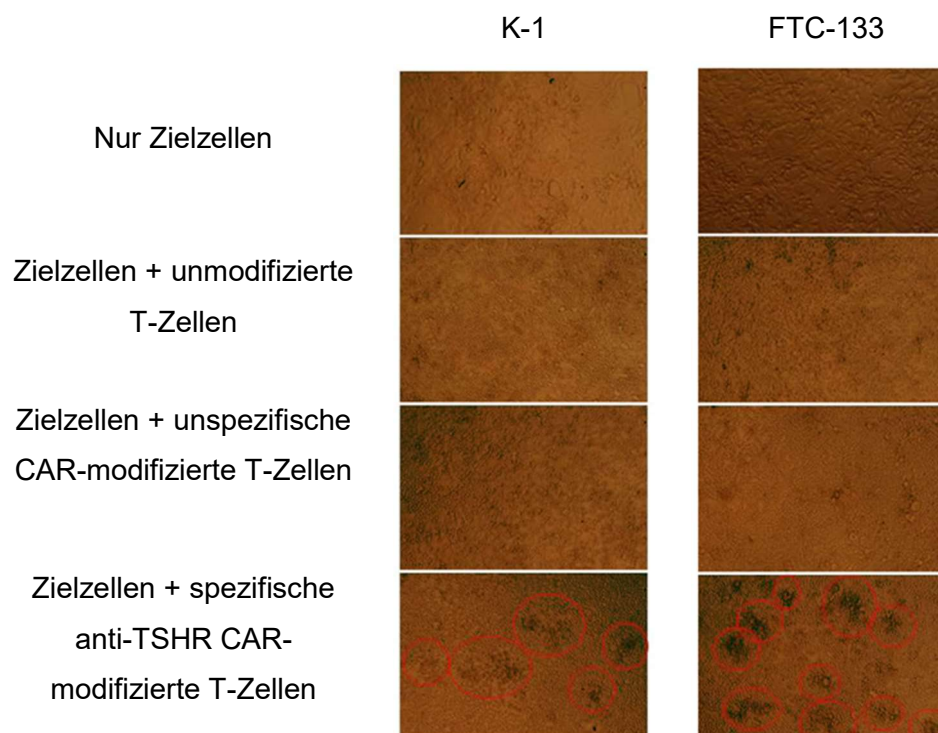


Abbildung 10 • Zelltod nach zwei Tagen in Ko-Kultur unter dem Mikroskop. Nur Zielzellen: K-1 papilläre Schilddrüsenkarzinomzellen oder FTC-133 follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen ohne Effektorzellen. Zielzellen und unmodifizierte T-Zellen: Schilddrüsenkarzinomzellen mit T-Zellen ohne CAR. Zielzellen und unspezifische CAR-T-Zellen: Schilddrüsenkarzinomzellen mit anti-CD19 CAR-T-Zellen. Zielzellen und spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen: Schilddrüsenkarzinomzellen mit anti-TSHR CAR-T-Zellen. Die roten Umkreisungen markieren Bereiche, in denen Zelltod stattgefunden hat.

3.3.2 Reduktion von GFP-markierten K-1- und FTC-133-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Ein deutlicher Zelltod der Zielzellen ist in der Ko-Kultur von Zielzellen und spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen erkennbar. Dieser zeigt sich in einer sichtbaren Reduktion der GFP-markierten K-1- und FTC-133-Zellen. Die zum Vergleich stehenden Ansätze weisen eine deutlich geringere Anzahl an untergegangenen Schilddrüsenkarzinomzellen auf (Abbildung 11).

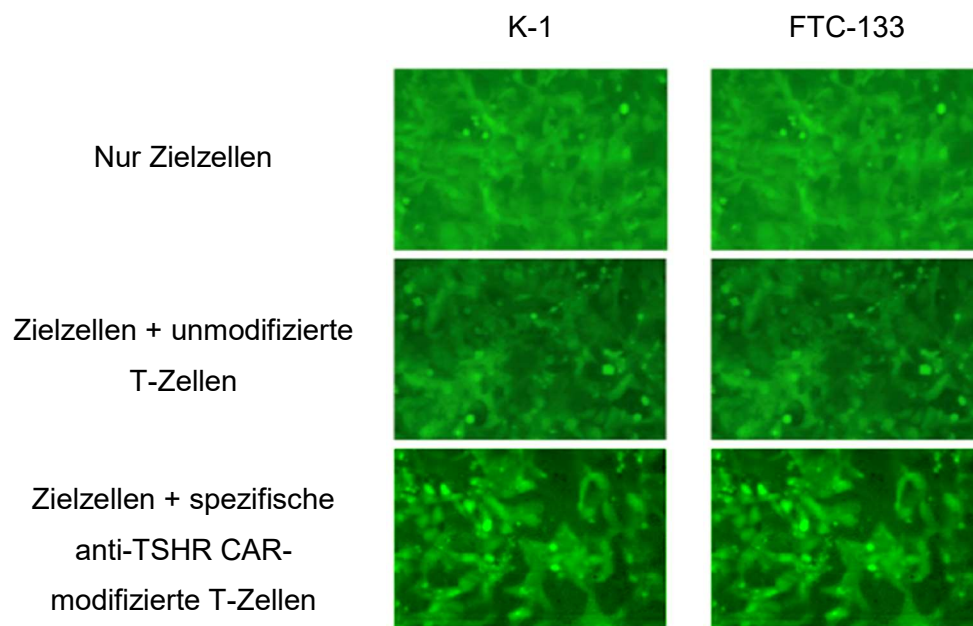


Abbildung 11 • Zielzelltod nach drei Tagen in Ko-Kultur unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nur Zielzellen: K-1- oder FTC-133-Zellen ohne T-Zellen. Zielzellen und unmodifizierte T-Zellen: K-1- und FTC-133-Zellen mit unveränderten T-Zellen ohne CAR. Zielzellen und spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen: K-1- und FTC-133-Zellen mit anti-TSHR CAR-T-Zellen.

3.3.3 Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse

Im Folgenden wird das Ergebnis der Caspase-3/7-Lumineszenzanalyse dargestellt. Die emittierte Lumineszenz wird in Relative Light Units (RLU) angegeben.

	Effektor-Lumineszenz [RLU]	M Effektor-Lumineszenz [RLU]
Unmodifizierte T-Zellen	6,54 * 10 ⁶	7,02 * 10 ⁶
	7,49 * 10 ⁶	
Unspezifische CAR-T	5,27 * 10 ⁶	5,56 * 10 ⁶
	5,83 * 10 ⁶	
Anti-TSHR CAR-T	6,43 * 10 ⁶	5,94 * 10 ⁶
	5,45 * 10 ⁶	

Tabelle 1 • Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der Effektorzellen ohne Zielzellen nach zwei Tagen in Kultur. M = Mittelwert.

	K-1-Lumineszenz [RLU]	K-1-Lumineszenz - M Effektor-Lumineszenz [RLU]
Nur K-1-Zellen	1,64 * 10 ⁶	1,64 * 10 ⁶
	1,36 * 10 ⁶	1,36 * 10 ⁶
	1,18 * 10 ⁶	1,18 * 10 ⁶
K-1-Zellen + unmodifizierte T-Zellen	8,48 * 10 ⁶	1,46 * 10 ⁶
	11,65 * 10 ⁶	4,63 * 10 ⁶
	10,61 * 10 ⁶	3,59 * 10 ⁶
K-1-Zellen + unspezifische CAR-T	6,25 * 10 ⁶	0,69 * 10 ⁶
	7,61 * 10 ⁶	2,05 * 10 ⁶
	7,30 * 10 ⁶	1,74 * 10 ⁶
K-1-Zellen + spez. anti-TSHR CAR-T	14,21 * 10 ⁶	8,27 * 10 ⁶
	10,73 * 10 ⁶	4,79 * 10 ⁶
	14,04 * 10 ⁶	8,1 * 10 ⁶

Tabelle 2 • Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der K-1-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. M = Mittelwert.

Der Zweistichproben-T-Test ergibt für den Vergleich von K-1-Zellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen mit K-1-Zellen + unmodifizierte T-Zellen einen T-Wert von 0,06. Für den Vergleich von K-1-Zellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen mit K-1-Zellen + unspezifische CAR-T-Zellen errechnet sich ein T-Wert von 0,01. Somit wird der Unterschied zwischen spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unspezifischen CAR-T-Zellen als signifikant zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ gewertet, während der Unterschied zwischen spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unmodifizierten T-Zellen die Signifikanz knapp verfehlt.

	FTC-133-Lumineszenz [RLU]	FTC-133-Lumineszenz - M Effektor-Lumineszenz [RLU]
Nur FTC-133-Zellen	1,91 * 10 ⁶	1,91 * 10 ⁶
	1,81 * 10 ⁶	1,81 * 10 ⁶
	1,59 * 10 ⁶	1,59 * 10 ⁶
FTC-133-Zellen + unmodifizierte T-Zellen	7,52 * 10 ⁶	0,5 * 10 ⁶
	9,05 * 10 ⁶	2,03 * 10 ⁶
	9,59 * 10 ⁶	2,57 * 10 ⁶
FTC-133-Zellen + unspezifische CAR- T	7,05 * 10 ⁶	1,49 * 10 ⁶
	8,87 * 10 ⁶	3,31 * 10 ⁶
	9,41 * 10 ⁶	3,85 * 10 ⁶
FTC-133-Zellen + spez. anti-TSHR CAR-T	10,10 * 10 ⁶	4,16 * 10 ⁶
	12,57 * 10 ⁶	6,63 * 10 ⁶
	12,93 * 10 ⁶	6,99 * 10 ⁶

Tabelle 3 • Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der FTC-133-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. M = Mittelwert.

Der Zweistichproben-T-Test ergibt für den Vergleich von FTC-133-Zellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen mit FTC-133-Zellen + unmodifizierte T-Zellen einen T-Wert von 0,02. Für den Vergleich von FTC-133-Zellen + spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen mit FTC-133-Zellen + unspezifische CAR-T-Zellen errechnet sich ein T-Wert von 0,06. Somit wird der Unterschied zwischen spezi-

fischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unmodifizierten T-Zellen als signifikant zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ gewertet, während der Unterschied zwischen spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unspezifischen CAR-T-Zellen die Signifikanz knapp verfehlt.

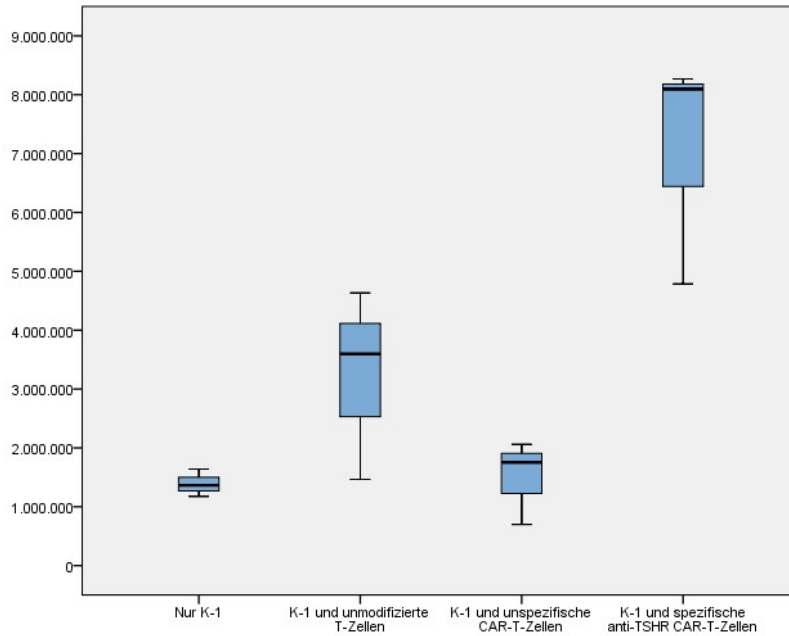


Abbildung 12 • Boxplots zur Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der K-1-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur.

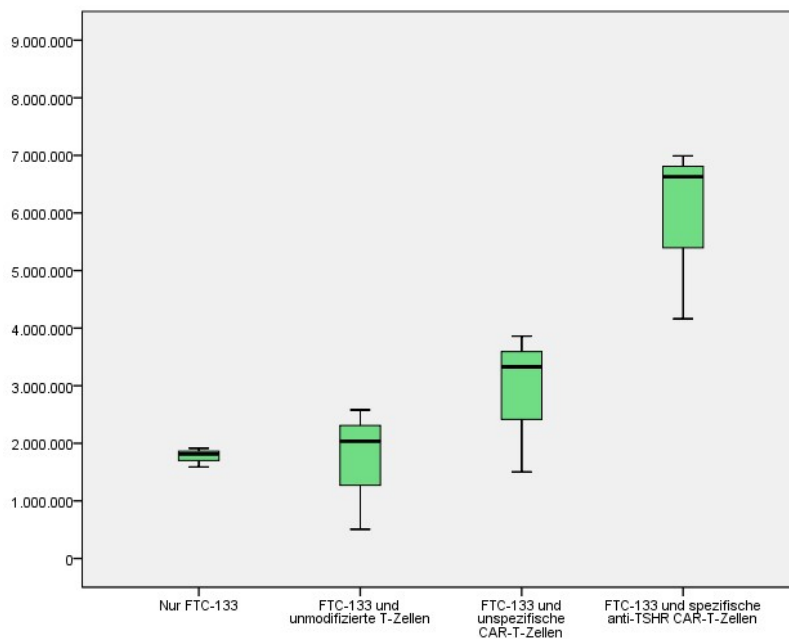


Abbildung 13 • Boxplots zur Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der FTC-133-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur.

Die Boxplots veranschaulichen die zytotoxische Überlegenheit der spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen sowohl in den K-1- als auch in den FTC-133-Zellen gegenüber allen anderen Ansätzen. Unter den Effektorzellen zeigen die unmodifizierten T-Zellen die zweithöchste Zytotoxizität gegen K-1-Zellen und die unspezifischen CAR-T-Zellen (anti-CD19) gegen FTC-133-Zellen. Jedoch führen in beiden Fällen die anti-TSHR CAR-T-Zellen mit deutlichem Abstand. Selbst das Minimum der gemessenen Lumineszenz im Ansatz mit spezifischen anti-TSHR CAR-T-Zellen übertrifft die gemessene Lumineszenz des Maximums der jeweils zweitbesten Effektorzellansätze. Insgesamt implizieren diese Ergebnisse eine leistungsfähige Zytotoxizität durch spezifische anti-TSHR CAR-T-Zellen gegen differenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen.

4 DISKUSSION

4.1 Anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen gegen das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom

In einer Studie von Min et al. wurde als tumorasspezifisches Antigen gegen das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, auch CD54 genannt) gewählt (Min et al., 2017). Viele Tumore, inklusive dem papillären und dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom, weisen eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf. Allogene anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen führten zu einer starken und selektiven Elimination von papillären und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen in vitro. Im Mausmodell mit systemischer Ausprägung des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms konnten allogene anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen durch eine einzige Anwendung eine umfassende Abtötung der Tumorzellen, eine Langzeitremission und eine signifikant verlängerte Überlebensdauer erreichen (Min et al., 2017). Im nächsten Schritt wurde eine weitere Annäherung unternommen, um möglichst realen Bedingungen zu entsprechen, indem einem Patienten anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen entnommen und autologe anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen hergestellt wurden. Sowohl in vitro als auch im Mausmodell bestätigte sich die therapeutische Wirkung der autologen anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen, wenn auch die Abtötung der Tumorzellen langsamer stattfand als im vorausgegangenen allogenen Modell (Min et al., 2017).

Min et al. komponierten ein CAR, dessen extrazellulärer Anteil ebenfalls aus einem scFv des gewählten tumorspezifischen Antigens bestand. Für die Transmembrandomäne und die intrazellulären Anteile wurden eine CD3 ζ -Kette und die kostimulatorischen Signaldomänen CD28 und 4-1BB verwendet. In unserem Aufbau fügten wir außerdem eine dritte kostimulatorische Signaldomäne hinzu: CD27. Sie unterstützt die antigenspezifische Expansion naiver T-Zellen und steigert die Generation sowie Langzeiterhaltung der T-Zell-Immunität (Hendriks et al., 2000). Zudem inkorporierten wir ein Caspase-9-Suizidgen wegen der potentiell lebensbedrohlichen Gefahr durch CAR-T-Zellen im klinischen Einsatz, welches Min et al. in zukünftigen Studien auch berücksichtigen wollen (Min et al., 2017). Die Transduktion der isolierten T-Zellen mit dem CAR erfolgte

in Übereinstimmung mit unserem Aufbau durch lentivirale Vektoren. Anschließend führten Min et al. eine antikörperbasierte Zellsortierung durch, um erfolgreich transduzierte von nicht transduzierten T-Zellen zu trennen. Während unsere Versuche allein in vitro an differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen durchgeführt wurden, bezogen Min et al. negative Kontrollen ein, verwendeten in vivo Mausmodelle und unterschieden zwischen allogenen und autologen Zytotoxizitätsanalysen. Unsere anti-TSHR CAR-T-Zellen zeigten bei einem Effektorzellen:Zielzellen-Verhältnis von 5:1 die besten Ergebnisse. Im Falle der anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen reichte ein Effektorzellen:Zielzellen-Verhältnis von 2,5:1 aus.

4.2 Kritik und Schwachstellen

4.2.1 Bedeutung des tumorspezifischen Antigens

Die wohl wichtigste Voraussetzung für die erfolgreiche klinische Anwendung von CAR-T-Zellen ist die Selektivität des tumorspezifischen Antigens für das Zielgewebe. In unseren Versuchen diente der Thyreotropin-Rezeptor als tumorspezifisches Antigen. Wie bereits beschrieben, ist der Thyreotropin-Rezeptor jedoch bei Weitem nicht spezifisch für das differenzierte Schilddrüsenkarzinom. Er findet sich auf allen Follikelepithelzellen des Schilddrüsengewebes sowie in geringerer Konzentration auch in zahlreichen weiteren extrathyreoidalen Geweben (siehe „Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) als Zielantigen auf differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen“, S. 19). Dadurch ist eine nicht zu vernachlässigende Off-Tumor-Zytotoxizität zu erwarten. Ein Ansatz die Off-Tumor-Zytotoxizität zu verringern, ist die Reduktion der Affinität des scFv (Caruso et al., 2015; Liu et al., 2015). Dadurch reichern sich die CAR-T-Zellen vor allem in Geweben mit hoher Dichte des tumorspezifischen Antigens an, während Gewebe mit geringer Dichte weitgehend verschont bleiben. Die Überlegenheit von niedrigaffinen CAR-T-Zellen zur Vermeidung einer systemischen Toxizität wurde bereits von Park et al. mit anti-ICAM-1 CAR-T-Zellen getestet und bestätigt (S. Park et al., 2017). In unserem Fall wird hauptsächlich die Schilddrüse von anti-TSHR CAR-T-Zellen betroffen sein. Sie wird voraussichtlich Schaden

nehmen, gegebenenfalls mit resultierendem Hypothyreodismus und der Notwendigkeit einer lebenslangen Substitution von Schilddrüsenhormonen. Dieser Nachteil ist allerdings vernachlässigbar, da dies bereits bewährte Praxis nach anderen thyreoablativen Verfahren wie der Thyreoidektomie und Radioiodablation ist.

Alternative tumorassoziierte Antigene gegen das differenzierte Schilddrüsenkarzinom könnten Thyreoperoxidase oder der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) sein (French & Haugen, 2018). Falls sich kein brauchbares tumorspezifisches Oberflächenantigen finden lässt, muss alternativ über den Einsatz von T-Cell-Receptor-mimic (TCRm) CARs nachgedacht werden, welche auf intrazelluläre Peptide reagieren, die im Proteasom gespalten durch den MHC-I-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Hierdurch wird das Ausmaß der potentiell in Frage kommenden tumorspezifischen Antigene entscheidend vergrößert. Voraussetzung für die Wirksamkeit dieses Ansatzes ist, dass die Tumorzellen die Expression von MHC-I-Komplexen nicht herabregulieren (Rafiq et al., 2017). Dies ist jedoch häufig der Fall. Der Vorteil der MHC-I-Unabhängigkeit von CAR-T-Zellen geht bei TCRm-CAR-T-Zellen verloren.

4.2.2 Versuchsaufbau

Auch wenn die stabile Langzeitexpression des CARs in T-Zellen und ihren Tochterzellen durch den lentiviralen Gentransfer bereits in anderen Studien belegt wurde (Essand & Loskog, 2013), gibt es in unseren Versuchen keinen Indikator für die CAR-Expression. Die Transduktionseffizienz des anti-TSHR CARs durch den lentiviralen Vektor ist unbekannt. Das zusätzliche Einbringen eines Markers bei der lentiviralen Transduktion, wie beispielsweise eines Luciferasegens, in dem CAR-Gen nachgeschalteter Position ermöglicht eine Beobachtung des CARs auch in vivo. Dadurch wird ein zusätzlicher Kontrollpunkt etabliert, der zur Sicherheitssteigerung in der CAR-T-Zell-Anwendung beiträgt. Nach der lentiviralen Transduktion kann zusätzlich eine Antikörpermarkierung der erfolgreich transduzierten CAR-T-Zellen erfolgen mit anschließender Zellsortierung.

Nur erfolgreich transduzierte CAR-T-Zellen gehen in die weiteren Versuchsstadien über.

In unserem Versuchsaufbau wurden die anti-TSHR CAR-T-Zellen lediglich mit den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133 kultiviert. Zur Abschätzung der Off-Tumor-Zytotoxizität wären weitere Kulturen mit negativen Kontrollen wünschenswert. Als solche könnten Karzinomzelllinien anderer Gewebe als des Schilddrüsengewebes, gesunde, nicht maligne entartete Zelllinien und Gewebe mit bekannter extrathyreoidaler TSHR-Lokalisation dienen. Für Letzteres würden sich beispielsweise HMEC-1-Zellen (Human Microvascular Endothelial Cells) anbieten (Ades et al., 1992). Außerdem gehen unsere Versuchsreihen nicht über in vitro Analysen hinaus. Der nächste Schritt wäre ein in vivo Mausmodell. Darüber hinaus sollte eine weitere Annäherung an die realistischen Gegebenheiten durch autologe, HLA-identische CAR-T- und Karzinomzellen in vivo getestet werden.

Zusätzlich zu der Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse kann die Auswertung der Zytotoxizität der CAR-T-Zellen durch eine Annexin-V-Propidiumiodid-Analyse ergänzt werden. Während die Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse nur die Apoptose auswertet, detektiert die Annexin-V-Propidiumiodid-Analyse zusätzlich die Nekrose. Annexin V zeigt durch die Bindung des Lipids Phosphatidylserin das Auftreten von Apoptose und Nekrose. Phosphatidylserin wird im Rahmen der hoch regulierten Apoptose von der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran auf die äußere Seite transloziert. Bei der Nekrose rupturiert die Zellmembran, wodurch das cytoplasmatische Phosphatidylserin für Annexin V zugänglich wird. Die Bindung wird durch eine Fluoreszenzmarkierung sichtbar (Crowley, Marfell, Scott, & Waterhouse, 2016). Der Farbstoff Propidiumiodid dient nach der Annexin-V-Färbung der Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose, da er nur nekrotische Zellen färbt. Er durchdringt die perforierte Zellmembran nekrotischer Zellen und bindet an Nukleinsäuren. Die intakte Zellmembran apoptotischer Zellen kann er jedoch nicht passieren (Straathof et al., 2005). Die Auswertung der Annexin-V-PI-Färbung erfolgt über Durchflusszytometrie (Crowley et al., 2016).

Im Gegensatz zu klinischen Studien, in denen die autologen Patienten-T-Zellen zur Generierung der CAR-T-Zellen verwendet werden, stammen die anti-TSHR CAR-T-Zellen nicht mit den HL-Antigenen der Tumorzelllinien K-1 und FTC-133 überein. Dadurch könnte das in-vitro-Ansprechen der Schilddrüsenkarzinomzellen auf die anti-TSHR CAR-T-Zell-Therapie zu einem unbekanntem Anteil durch eine allogene Reaktion gegen die Schilddrüsenkarzinomzellen verstärkt worden sein. Der Zytotoxizitätsanteil, der allein auf die anti-TSHR CAR-T-Zellen entfällt, ist nicht ermittelbar. So besteht die Gefahr die anti-TSHR CAR-T-Zell-Zytotoxizität in vitro zu überschätzen.

Für die Isolation des scFv verwendeten wir den murinen monoklonalen anti-TSHR Antikörper 3BD10 (Chen et al., 2015; Hou et al., 2008), während die Zelllinien K-1 und FTC-133 humane papilläre beziehungsweise follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen enthalten (Aldrich). Diese artübergreifende Anwendung birgt ein immunogenes Potential, welches ebenfalls die Gefahr birgt die anti-TSHR CAR-T-Zell-Zytotoxizität zu überschätzen. In Zukunft versprechen humanisierte Antikörper als Spender des scFv praxisbezogener Bedingungen (Chen et al., 2015; Hou et al., 2008). Dazu wird das scFv aus der variablen schweren (V_H) und der variablen leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Antikörpers entnommen. Jede Kette besteht aus je drei Complementarity-Determining Regionen (CDR) zur Antigenbindung und vier Framework Regionen (FR), die zu Stabilität verhelfen. Die Humanisierung eines murinen Antikörpers erfolgt durch die Übertragung der antigenbindenden CDR des murinen Antikörpers (Donor-Antikörper) in die FR des humanen Antikörpers (Akzeptor-Antikörper) (Tsurushita, Hinton, & Kumar, 2005).

4.3 Herausforderungen in der klinischen Anwendung

4.3.1 CAR-T-Zell-Penetration

Die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen gegen hämatologische Erkrankungen konnte bereits mehrfach in frühen Phasen klinischer Studien bestätigt werden, insbesondere gegen CD19-positive hämatologische Erkrankungen (Grupp et al.,

2013; Kochenderfer et al., 2012; Porter et al., 2011). Gegen solide Tumore wie das Nierenzellkarzinom oder Neuroblastome zeigten CAR-T-Zellen jedoch bisher in klinischen Studien enttäuschende Ergebnisse (Lamers et al., 2013; J. R. Park et al., 2007). Auch wenn die Gründe für diese Diskrepanz noch nicht vollständig verstanden sind, mag es an der erschwerten Penetration solider Tumoren durch CAR-T-Zellen liegen, da sich solide Tumoren mit einem immunsuppressiven Mikromilieu umgeben (Gajewski et al., 2006). T-Zellen gelangen hoch reguliert zu ihrem Effektorort. Vermittelt durch Selektine rollen sie entlang des Endothels der Gefäße, bis sie durch Integrine am Endothel anheften. Integrine sind Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche aller tierischer Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten. Dem Zellarrest folgt die Extravasation und Migration der T-Zelle in das Zielgewebe. Das immunsuppressive Mikromilieu solider Tumoren behindert jedoch all diese Schritte, sodass T-Zellen und CAR-T-Zellen nur in äußerst geringer, immunologisch insuffizienter Anzahl an ihren Wirkungsort gelangen (Kershaw et al., 2013).

Darüber hinaus wird angenommen, dass maligne hämatologische Erkrankungen Moleküle exprimieren, die eine kostimulatorische Wirkung auf CAR-T-Zellen ausüben, während es soliden Tumoren an solchen Molekülen mangelt (Kershaw et al., 2013). Diese Problematik kann bei der Konstruktion der CAR-Ektodomäne Beachtung finden. Neben dem scFv zur tumorantigenspezifischen Bindung ist es möglich, CAR-T-Zellen mit einem weiteren Rezeptor passend zu den Chemokinen im immunsuppressiven Mikromilieu solider Tumoren auszustatten. Diese bispezifischen CAR-T-Zellen verbessern die CAR-T-Zell-Migration in das Tumorgewebe. Eine größere Anzahl an infiltrierenden CAR-T-Zellen steigert die Chance auf eine suffiziente antitumoröse Zytotoxizität maßgeblich. Als Ziel kann beispielsweise der Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR) dienen, der sich in hoher Dichte in der unmittelbaren Umgebung solider Tumoren befindet (Kershaw et al., 2013).

4.3.2 CAR-T-Zell-Persistenz

Für eine erfolgreiche klinische Anwendung in vivo ist eine dauerhafte CAR-T-Zell-Persistenz Voraussetzung. Zur Steigerung der Persistenz zeigen sich wenig differenzierte, insbesondere Memory-T-Stammzellen als Substrat für CAR-T-Zellen als vorteilhaft. Zusätzlich steigert eine effektive Aktivierung der CAR-T-Zellen über antiapoptotische Signale, ausgelöst durch die kostimulatorischen Moleküle der Endodomäne des CARs, die Persistenz maßgeblich. Weitere genetische Modifikationen zur Reduktion der Fas-Rezeptoren auf der CAR-T-Zell-Oberfläche prolongieren die CAR-T-Zell-Persistenz ebenfalls (Kershaw et al., 2013). Zudem beeinflussen eine Präkonditionierung vor der CAR-T-Zell-Applikation und die Dosis verabreichter CAR-T-Zellen die Persistenz. Die Präkonditionierung erfolgt mittels lymphodepletierender Chemotherapie mit Cyclophosphamid oder Fludarabin und Radiatio. Letztere führt zu einer Organisation chaotisch angeordneter Tumorgefäße. Eine Reduzierung körpereigener Immunzellen schafft günstige Bedingungen für die Expansion der infundierten CAR-T-Zellen im Patienten-organismus (Buchholz et al., 2018; Kershaw et al., 2013). Dabei muss eine resultierende Infektanfälligkeit durch die Leukozyten-depletion in Kauf genommen werden. Das Tumorsprechen wird bedeutend durch die simultane Zufuhr des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 bei CAR-T-Zell-Applikation erhöht (Essand & Loskog, 2013; Kershaw et al., 2013; T. S. Park et al., 2011).

4.4 Anregungen für die Weiterentwicklung

Die Verwendung eines scFv als antigenbindenden Teil eines CARs ist bisher die am häufigsten durchgeführte Variante. Jedoch zeigen die meisten scFv die Tendenz zu aggregieren (Gil & Schrum, 2013). Dadurch kommt es unabhängig von der Bindung des CARs an sein spezifisches Antigen zu einer konstitutionellen CAR-T-Zell-Aktivierung, die wiederum in einem beschleunigten Verbrauch der CAR-T-Zellen resultiert (Harris & Kranz, 2016). Duan et. al testeten auf der Suche nach einer Alternative zum scFv das Fab (Fragment antigen binding)

eines Antikörpers in Kombination mit den intrazellulären Signaldomänen eines TCR als antigenbindendes Element eines CARs. Das Fab zeigt im Vergleich zum scFv eine höhere Antigenaffinität und Stabilität. Zudem konnte in den Versuchen eine stabile Sekretion der Zytokine IL-2 und IFN- γ nachgewiesen werden (Duan, Huang, & Jing, 2019). IL-2 hat einen starken, fördernden Einfluss auf die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung zu Effektor- und Memory-T-Zellen (Bachmann & Oxenius, 2007) und IFN- γ fördert die Expansion und Differenzierung zu Memory-T-Zellen von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (Tewari et al., 2007). Die intrazellulären Signaldomänen des TCR treten an Stelle der zumeist verwendeten Signaldomänen 4-1BB und CD28. Dadurch wird der natürliche Prozess der T-Zell-Aktivierung nachgeahmt, welcher nicht so stark ist wie der durch 4-1BB und CD28. Dadurch erhoffen sich Duan et. al eine verlängerte Lebensspanne der CAR-T-Zellen.

Unkontrollierbare Nebenwirkungen wie der Zytokinsturm bleiben potentiell lebensbedrohliche Gefahren beim Einsatz von CAR-T-Zellen. Wie zuvor beschrieben helfen inkorporierte Suizidgene die Auswirkungen von CAR-T-Zellen mit sofortiger Wirkung selektiv zu stoppen. Die induzierbare Caspase 9 funktioniert wie ein „Aus-Schalter“ (siehe „Inkorporation eines Caspase-9-Suizidgens“, S. 23). Um noch mehr Kontrolle über die CAR-T-Zell-Aktivität zu erhalten, ist das zusätzliche Einfügen eines „An-Schalters“ denkbar. Dieses Prinzip basiert auf einem induzierbaren MyD88/CD40-Molekül (iMC). Damit wäre die CAR-T-Zell-Aktivierung nicht mehr alleinig von der Bindung des spezifischen Antigens abhängig, sondern zudem von der externen Applikation eines Small Molecules. Erste präklinische Studien versprechen zudem eine verstärkte CAR-T-Zell-Aktivierung und -Proliferation (Foster et al., 2017).

Die Sorgen um eine ungezielte Insertion von CAR-Genen durch virale Vektoren und Transposonsysteme wird von neuen genmodifizierenden Instrumenten wie CRISPR/Cas9 adressiert. Sie sind dazu in der Lage, Gene an eine bestimmte Stelle im Genom zu inserieren. Durch das gezielte Einsetzen der CAR-Gene in den T-Zell-Rezeptor- α -Locus (TRAC) wurde das Tumoransprechen im Mausmodell mit akuter lymphatischer Leukämie gesteigert (Eyquem et al., 2017).

Ein weiterer interessanter Ansatz beschäftigt sich mit der Kombination von einem CAR mit anderen Immunzellen als den T-Zellen, wie beispielsweise den natürlichen Killerzellen (NKZ) und Phagozyten wie Makrophagen (Morrissey et al., 2018; Oelsner et al., 2019). Regulatorische T-Zellen, die um ein Alloantigen-spezifisches CAR modifiziert wurden (CAR-Treg), zeigten bereits Vorteile gegenüber unmodifizierten regulatorischen T-Zellen in der Bekämpfung der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) im Rahmen von Transplantationen, die durch allogene T-Zellen ausgelöst wird (MacDonald et al., 2016). Derzeit werden ebenfalls chimäre Autoantigenrezeptor-T-Zellen (CAART) getestet, welche selektiv pathologische Autoimmunzellen eliminieren sollen (Ellebrecht et al., 2016). Damit wird gezeigt, dass CARs auch großes Potential außerhalb der Onkologie bergen.

Neben den vielfältigen biochemischen Herausforderungen zur Optimierung von CAR-T-Zellen werden zukünftig auch wirtschaftliche Aspekte großen Einfluss auf den klinischen Einsatz von CAR-T-Zellen haben. Derzeit kostet eine Therapie mit Kymriah® von Novartis 320 000 €, wodurch den Patienten und dem Krankenversicherungssystem eine hohe finanzielle Last auferlegt wird (Gesundheitswesen, 2018). Dies ist den hohen Kosten für den viralen Gentransfer und für die Manufaktur der CAR-T-Zellen geschuldet. Zur Senkung der Kosten werden derzeit nicht-virale Gentransfermethoden getestet, beispielsweise „Sleeping Beauty Transposons“, die ebenfalls zur stabilen Insertion von CAR-Genen fähig sind (Kebriaei et al., 2016). Den hohen Manufaktorkosten möchte man mit serienmäßig produzierten universellen allogenen CAR-T-Zellen entgegenwirken, die mit den T-Zellen eines Spenders hergestellt und kompatibel für möglichst alle Empfänger sind. Dies wird durch weitere genetische Modifikationen erreicht, die die T-Zell-Rezeptor-Expression verhindert und somit die HLA-vermittelte allogene Immunreaktion verhindert. Erste klinische Erfolge wurden bereits mit UCARTCD19® von Cellectis bei einem 11 Monate alten Mädchen mit rezidivierender akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erzielt (Ratner, 2016).

5 FAZIT

Die Ergebnisse dieser in vitro Studie legen nahe, dass anti-TSHR CAR-T-Zellen Potential in der Behandlung des rekurrenten, radioiodrefraktären und TSHR-positiven differenzierten Schilddrüsenkarzinoms besitzen. Wir konnten zeigen, dass die differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133 den Thyreotropin-Rezeptor exprimieren und dieser somit ein geeignetes Ziel für unsere CAR-T-Zellen darstellt. Die optisch und lumineszenzbasiert gemessene Reduktion von K-1- und FTC-133 in Ko-Kultur mit anti-TSHR CAR-T-Zellen zeigte eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität durch anti-TSHR CAR-T-Zellen gegenüber unspezifischen CAR-T-Zellen bei K-1-Zellen (T-Wert = 0,01) und durch anti-TSHR CAR-T-Zellen gegenüber unmodifizierten T-Zellen bei FTC-133-Zellen (T-Wert = 0,02). Die Signifikanz bei anti-TSHR CAR-T-Zellen gegenüber unmodifizierten T-Zellen mit K-1-Zellen (T-Wert = 0,06) und bei anti-TSHR CAR-T-Zellen gegenüber unspezifischen CAR-T-Zellen mit FTC-133-Zellen (T-Wert = 0,06) wurde knapp verfehlt (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Zukünftige Studien sollten sich einer Erhöhung der in-vitro-Fallzahlen, der Übertragung in ein in-vivo-Modell und schließlich der Optimierung des CARs für den klinischen Einsatz widmen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel:

Die Prognose des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms ist unter den etablierten Standardtherapien der operativen Therapie, der Radioiodtherapie und der dauerhaften Thyreotropin-Suppression ausgesprochen gut. Jedoch mangelt es an Therapiemöglichkeiten gegen das rezurrenente, radioiodrefraktäre differenzierte Schilddrüsenkarzinom. Langzeitergebnisse zu den erst vor Kurzem zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib liegen noch nicht vor. Diese Arbeit soll das Potential chimärer Antigen-Rezeptor T-Zellen (CAR-T-Zellen), die insbesondere gegen hämatoonkologische Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt wurden, in der Therapie des rezurrenten, radioiodrefraktären und TSHR-positiven differenzierten Schilddrüsenkarzinoms evaluieren.

Material und Methoden:

Als tumorspezifisches Tumorantigen wird der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) gewählt. Sein Auftreten in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien K-1 und FTC-133 wird mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot bewiesen. Aus Vollblutproben gewonnene T-Zellen werden mittels lentiviraler Vektoren genmodifiziert das anti-TSHR CAR auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Die Bindung der anti-TSHR CAR-T-Zellen an K-1- und FTC-133-Zellen wird durch eine weitere Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Folgend werden Ko-Kulturen mit Zielzellen (K-1- und FTC-133-Zellen) und Effektorzellen (unmodifizierte und CAR-T-Zellen) angelegt. Die Zytotoxizität gegen die Zielzellen wird unter dem Mikroskop, dem Fluoreszenzmikroskop (nach GFP-Markierung der Zielzellen) und mittels einer Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse bewertet.

Ergebnisse:

Die Zelllinien K-1 und FTC-133 exprimieren den Thyreotropin-Rezeptor. Anti-TSHR CAR-T-Zellen binden diesen und werden darauffolgend aktiviert.

Das Signifikanzniveau für die Zytotoxizitätsanalyse wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Für K-1-Zellen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unspezifischen CAR-T-Zellen (T-Wert = 0,01), während anti-TSHR CAR-T-Zellen im Vergleich mit unmodifizierten T-Zellen die Signifikanz

knapp verfehlen (T-Wert = 0,06). Für FTC-133-Zellen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unmodifizierten T-Zellen (T-Wert = 0,02), während anti-TSHR CAR-T-Zellen im Vergleich zu unspezifischen CAR-T-Zellen die Signifikanz knapp verfehlen (T-Wert = 0,06).

Fazit:

Die Ergebnisse dieser in vitro Studie legen nahe, dass anti-TSHR CAR-T-Zellen Potential in der Behandlung des rekurrenten, radioiodrefraktären und TSHR-positiven differenzierten Schilddrüsenkarzinoms besitzen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

^{18}F -FDG-PET	^{18}F -Fluordesoxyglucose Positronen-Emissions-Tomographie
ALL	akute lymphatische Leukämie
ATA	American Thyroid Association
BCMA	B-Cell Maturation Antigen
BSA	Bovine Serum Albumine
c-Kit	c-Kit-Kinase
CAART	chimäre Autoantigenrezeptor-T-Zellen
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CAR-T	chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity-Determining Region
CLL	chronische lymphatische Leukämie
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DLBCL	großzelliges B-Zell-Lymphom
Fab	Fragment antigen binding
FBS	Foetal Bovine Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FR	Framework Region
GD2	Disialogangliosid 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GVHD	Graft-versus-Host-Disease

HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIV	Human Immundeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMEC	Human Microvascular Endothelial Cells
HPA	Health Protection Agency
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
IL-13R α 2	Interleukin-13-Rezeptor α 2
iMC	induzierbares MyD88/CD40
INF- γ	Interferon γ
LRR	leucinreiche Repeats
M	Mittelwert
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAPKK, Kinase der MAPK
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
NKG2D	Natural Killer Cell Receptor Group 2 D
NKZ	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie
PHA	Phytohämagglutinin

PI	Propidiumiodid
rhTSH	rekombinantes humanes TSH, Thyreotropin
RAF	RAF-Kinase
RET	RET-Kinase
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RPM	Rocks Per Minute
scFv	Single Chain Fragment Variable
TCR	T-Cell Receptor
TCRm	T-Cell Receptor mimic
TMD	Transmembrandomäne
TRAC	T-Zell-Rezeptor- α -Locus
Treg	regulatorische T-Zellen
TSH	Thyroid Stimulating Hormone, Thyreotropin
TSHR	Thyroid Stimulating Hormone Receptor, Thyreotropin-Rezeptor
V _H	variable schwere Kette
V _L	variable leichte Kette
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

- Abbildung 1 Zusammensetzung eines chimären Antigenrezeptors (CAR) (Lipowska-Bhalla et al., 2012). Seite 18.
- Abbildung 2 Struktur des Thyreotropin-Rezeptors (TSHR) (Davies et al., 2005). Seite 19.
- Abbildung 3 Primäre Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Kette des murinen anti-TSHR Antikörpers 3BD10 (Chen et al., 2015). Seite 20.
- Abbildung 4 Dreidimensionale Struktur des 3BD10 Fab (Fragment antigen binding) (Chen et al., 2015). Seite 20.
- Abbildung 5 Ficoll-Dichtegradienten-Zellisolation. Seite 32.
- Abbildung 6 Ko-Kultur der Ziel- und Effektorzellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte als Vorbereitung für eine folgende Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse. Seite 40.
- Abbildung 7 Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen murinen anti-TSHR Antikörper als primären Antikörper. Seite 42.
- Abbildung 8 Western Blot mit dem monoklonalen murinen anti-TSHR Antikörper als primären Antikörper. Seite 43.
- Abbildung 9 Immunfluoreszenzfärbung mit anti-TSHR CAR-T-Zellen als primären Antikörper. Seite 44.
- Abbildung 10 Zielzelltod nach zwei Tagen in Ko-Kultur unter dem Mikroskop. Seite 45.
- Abbildung 11 Zielzelltod nach drei Tagen in Ko-Kultur unter dem Fluoreszenzmikroskop. Seite 46.

Abbildung 12	Boxplots zur Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der K-1-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. Seite 49.
Abbildung 13	Boxplots zur Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der FTC-133-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. Seite 49.
Tabelle 1	Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der Effektorzellen ohne Zielzellen nach zwei Tagen in Kultur. Seite 47.
Tabelle 2	Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der K-1-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. Seite 47.
Tabelle 3	Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse der FTC-133-Zellen und Effektorzellen nach zwei Tagen in Ko-Kultur. Seite 48.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, E., Mariani, R. C., Yu, W., Wu, X. B., Ando, T., Li, Y., . . . Zaidi, M. (2003). TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*, *115*(2), 151-162.
- Abken, H. (2015). Adoptive therapy with CAR redirected T cells: the challenges in targeting solid tumors. *Immunotherapy*, *7*(5), 535-544. doi:10.2217/imt.15.15
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., & Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*, *99*(6), 683-690.
- Aldrich, S. FTC-133 Cell Line human. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/94060901?lang=de®ion=DE>
- Aldrich, S. K1 Cell Line human. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/92030501?lang=de®ion=DE>
- Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*, *8*(12), 1142-1148. doi:10.1038/sj.embor.7401099
- Bahn, R. S., Dutton, C. M., Natt, N., Joba, W., Spitzweg, C., & Heufelder, A. E. (1998). Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, *83*(3), 998-1002. doi:10.1210/jcem.83.3.4676
- Balzan, S., Nicolini, G., Forini, F., Boni, G., Del Carratore, R., Nicolini, A., . . . Iervasi, G. (2007). Presence of a functional TSH receptor on human erythrocytes. *Biomed Pharmacother*, *61*(8), 463-467. doi:10.1016/j.biopha.2007.04.009
- Baudin, E., Travagli, J. P., Ropers, J., Mancusi, F., Bruno-Bossio, G., Caillou, B., . . . Schlumberger, M. (1998). Microcarcinoma of the thyroid gland: the Gustave-Roussy Institute experience. *Cancer*, *83*(3), 553-559.
- Boesteanu, A. C., & Katsikis, P. D. (2009). Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol*, *21*(2), 69-77. doi:10.1016/j.smim.2009.02.005
- Brennan, M. D., Bergstralh, E. J., van Heerden, J. A., & McConahey, W. M. (1991). Follicular thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*, *66*(1), 11-22.
- Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M., & Gilham, D. E. (2010). The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta

- transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol*, *184*(12), 6938-6949.
doi:10.4049/jimmunol.0901766
- Brose, M. S., Nutting, C. M., Jarzab, B., Elisei, R., Siena, S., Bastholt, L., . . . Schlumberger, M. J. (2014). Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*, *384*(9940), 319-328. doi:10.1016/s0140-6736(14)60421-9
- Brose, M. S., Worden, F. P., Newbold, K. L., Guo, M., & Hurria, A. (2017). Effect of Age on the Efficacy and Safety of Lenvatinib in Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer in the Phase III SELECT Trial. *J Clin Oncol*, *35*(23), 2692-2699.
doi:10.1200/jco.2016.71.6472
- Buchholz, C. J., Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., & Keller-Stanislawski, B. (2018). CAR-T-Zell-Therapie: Aussichten und Risiken. *Dtsch Arztebl International*, *115*(7), -38-.
doi:10.3238/PersOnko.2018.02.16.07
- Bundesministerium für Umwelt, N. u. n. S. (2011). Strahlenschutz in der Medizin - Richtlinie zur Strahlenschutzverordnung (StrlSchV). Retrieved from <https://www.bmu.de/gesetz/richtlinie-zur-strahlenschutzverordnung/>
- Caruso, H. G., Hurton, L. V., Najjar, A., Rushworth, D., Ang, S., Olivares, S., . . . Cooper, L. J. (2015). Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res*, *75*(17), 3505-3518.
doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0139
- Ceuppens, J. L., Baroja, M. L., Lorre, K., Van Damme, J., & Billiau, A. (1988). Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol*, *141*(11), 3868-3874.
- Chen, C. R., Hubbard, P. A., Salazar, L. M., McLachlan, S. M., Murali, R., & Rapoport, B. (2015). Crystal structure of a TSH receptor monoclonal antibody: insight into Graves' disease pathogenesis. *Mol Endocrinol*, *29*(1), 99-107. doi:10.1210/me.2014-1257
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., Mandel, S. J., . . . Tuttle, R. M. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, *19*(11), 1167-1214.
doi:10.1089/thy.2009.0110
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, *2016*(11). doi:10.1101/pdb.prot087288

- Daumerie, C., Ludgate, M., Costagliola, S., & Many, M. C. (2002). Evidence for thyrotropin receptor immunoreactivity in pretibial connective tissue from patients with thyroid-associated dermopathy. *Eur J Endocrinol*, *146*(1), 35-38.
- Davies, T. F., Ando, T., Lin, R.-Y., Tomer, Y., & Latif, R. (2005). Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(8), 1972-1983. doi:10.1172/JCI26031
- Diessl, S., Holzberger, B., Mader, U., Grelle, I., Smit, J. W., Buck, A. K., . . . Verburg, F. A. (2012). Impact of moderate vs stringent TSH suppression on survival in advanced differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *76*(4), 586-592. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04272.x
- Donnini, D., Ambesi-Impimbato, F. S., & Curcio, F. (2003). Thyrotropin stimulates production of procoagulant and vasodilative factors in human aortic endothelial cells. *Thyroid*, *13*(6), 517-521. doi:10.1089/105072503322238764
- Duan, H., Huang, H., & Jing, G. (2019). An Antibody Fab Fragment-based Chimeric Antigen Receptor Could Efficiently Eliminate Human Thyroid Cancer Cells. *J Cancer*, *10*(8), 1890-1895. doi:10.7150/jca.30163
- Ellebrecht, C. T., Bhoj, V. G., Nace, A., Choi, E. J., Mao, X., Cho, M. J., . . . Payne, A. S. (2016). Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*, *353*(6295), 179-184. doi:10.1126/science.aaf6756
- Endokrinologie, D. G. f. (2016). Schilddrüsenknoten. Retrieved from <https://www.endokrinologie.net/krankheiten-schilddruese-knoten.php>
- Essand, M., & Loskog, A. S. (2013). Genetically engineered T cells for the treatment of cancer. *J Intern Med*, *273*(2), 166-181. doi:10.1111/joim.12020
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S. J., Hamieh, M., Cunanan, K. M., . . . Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, *543*(7643), 113-117. doi:10.1038/nature21405
- Foster, A. E., Mahendravada, A., Shinnars, N. P., Chang, W. C., Crisostomo, J., Lu, A., . . . Spencer, D. M. (2017). Regulated Expansion and Survival of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Using Small Molecule-Dependent Inducible MyD88/CD40. *Mol Ther*, *25*(9), 2176-2188. doi:10.1016/j.ymthe.2017.06.014
- Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2004). Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *The Journal of Immunology*, *172*(8), 4661-4665. doi:10.4049/jimmunol.172.8.4661
- French, J. D., & Haugen, B. R. (2018). Thyroid cancer: CAR T cell therapy - potential in advanced thyroid cancer? *Nat Rev Endocrinol*, *14*(1), 10-11. doi:10.1038/nrendo.2017.160

- Gajewski, T. F., Meng, Y., Blank, C., Brown, I., Kacha, A., Kline, J., & Harlin, H. (2006). Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev*, *213*, 131-145. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00442.x
- Gesundheitswesen, I. f. Q. u. W. i. (2018). Tisagenlecleucel (akute lymphatische B-Zell-Leukämie). 41. Retrieved from file:///C:/Users/nicol/AppData/Local/Temp/G18-11_Tisagenlecleucel_Bewertung-35a-Absatz-1-Satz-11-SGB-V_V1-0.pdf
- Gil, D., & Schrum, A. G. (2013). Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. *Adv Biosci Biotechnol*, *4(4a)*, 73-84. doi:10.4236/abb.2013.44A011
- Gmyrek, G. B., Pingel, J., Choi, J., & Green, J. M. (2017). Functional analysis of acquired CD28 mutations identified in cutaneous T cell lymphoma. *Cell Immunol*, *319*, 28-34. doi:10.1016/j.cellimm.2017.07.002
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86(24)*, 10024-10028.
- Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., . . . June, C. H. (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, *368(16)*, 1509-1518. doi:10.1056/NEJMoa1215134
- Harris, D. T., & Kranz, D. M. (2016). Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *37(3)*, 220-230. doi:10.1016/j.tips.2015.11.004
- Hartmann, J., Schussler-Lenz, M., Bondanza, A., & Buchholz, C. J. (2017). Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*, *9(9)*, 1183-1197. doi:10.15252/emmm.201607485
- Haugen, B. R. (2017). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed? *Cancer*, *123(3)*, 372-381. doi:10.1002/cncr.30360
- Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., . . . Wartofsky, L. (2016). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, *26(1)*, 1-133. doi:10.1089/thy.2015.0020
- Haugen, B. R., & Sherman, S. I. (2013). Evolving approaches to patients with advanced differentiated thyroid cancer. *Endocr Rev*, *34(3)*, 439-455. doi:10.1210/er.2012-1038

- Hay, I. D., Bergstralh, E. J., Goellner, J. R., Ebersold, J. R., & Grant, C. S. (1993). Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery*, *114*(6), 1050-1057; discussion 1057-1058.
- Hendriks, J., Gravestein, L. A., Tesselaar, K., van Lier, R. A., Schumacher, T. N., & Borst, J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol*, *1*(5), 433-440. doi:10.1038/80877
- Ho, A. L., Grewal, R. K., Leboeuf, R., Sherman, E. J., Pfister, D. G., Deandreis, D., . . . Fagin, J. A. (2013). Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med*, *368*(7), 623-632. doi:10.1056/NEJMoa1209288
- Hou, S., Li, B., Wang, L., Qian, W., Zhang, D., Hong, X., . . . Guo, Y. (2008). Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modelling. *J Biochem*, *144*(1), 115-120. doi:10.1093/jb/mvn052
- Ito, Y., & Miyauchi, A. (2018). Active Surveillance as First-Line Management of Papillary Microcarcinoma. *Annu Rev Med*. doi:10.1146/annurev-med-051517-125510
- Iulucci, J. D., Oliver, S. D., Morley, S., Ward, C., Ward, J., Dalgarno, D., . . . Berger, H. J. (2001). Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, *41*(8), 870-879.
- Iwakuma, T., Cui, Y., & Chang, L. J. (1999). Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology*, *261*(1), 120-132. doi:10.1006/viro.1999.9850
- Jung, D. B. (2018). Genterapie bei Leukämie: Novartis erhält EU-Zulassung für Kymriah. *Deutsche Apotheker Zeitung*. Retrieved from <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2018/08/27/genterapie-bei-leukaemie-novartis-erhaelt-eu-zulassung-fuer-kymriah>
- Kebriaei, P., Singh, H., Huls, M. H., Figliola, M. J., Bassett, R., Olivares, S., . . . Cooper, L. J. (2016). Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest*, *126*(9), 3363-3376. doi:10.1172/jci86721
- Kershaw, M. H., Westwood, J. A., & Darcy, P. K. (2013). Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *13*(8), 525-541. doi:10.1038/nrc3565
- Kim, H., Kim, H. I., Kim, S. W., Jung, J., Jeon, M. J., Kim, W. G., . . . Chung, J. H. (2018). Prognosis of Differentiated Thyroid Carcinoma with Initial Distant Metastasis: A Multicenter Study in Korea. *Endocrinol Metab (Seoul)*, *33*(2), 287-295. doi:10.3803/EnM.2018.33.2.287

- Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Wilson, W. H., Spaner, D. E., Maric, I., . . . Rosenberg, S. A. (2012). B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, *119*(12), 2709-2720. doi:10.1182/blood-2011-10-384388
- Lamers, C. H., Sleijfer, S., van Steenbergen, S., van Elzakker, P., van Krimpen, B., Groot, C., . . . Gratama, J. W. (2013). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther*, *21*(4), 904-912. doi:10.1038/mt.2013.17
- Lipowska-Bhalla, G., Gilham, D. E., Hawkins, R. E., & Rothwell, D. G. (2012). Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunol Immunother*, *61*(7), 953-962. doi:10.1007/s00262-012-1254-0
- Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E. C., . . . Zhao, Y. (2015). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res*, *75*(17), 3596-3607. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0159
- LiVolsi, V. A., & Asa, S. L. (1994). The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*, *4*(2), 233-236. doi:10.1089/thy.1994.4.233
- Lopez-Penabad, L., Chiu, A. C., Hoff, A. O., Schultz, P., Gaztambide, S., Ordonez, N. G., & Sherman, S. I. (2003). Prognostic factors in patients with Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *Cancer*, *97*(5), 1186-1194. doi:10.1002/cncr.11176
- M. Dietlein, W. E., F. Grünwald, M. Lassmann, F.A. Verburg, M. Luster. (2015). S1-Leitlinie: Radioiodtherapie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom (Version 4). *Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin*.
- MacDonald, K. G., Hoeppli, R. E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D. S., Orban, P. C., . . . Levings, M. K. (2016). Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest*, *126*(4), 1413-1424. doi:10.1172/jci82771
- Mazzaferri, E. L. (1993). Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*, *328*(8), 553-559. doi:10.1056/nejm199302253280807
- Mazzaferri, E. L., & Jhiang, S. M. (1994). Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*, *97*(5), 418-428.
- Min, I. M., Shevlin, E., Vedvyas, Y., Zaman, M., Wyrwas, B., Scognamiglio, T., . . . Jin, M. M. (2017). CAR T Therapy Targeting ICAM-1 Eliminates Advanced Human Thyroid Tumors. *Clinical Cancer Research*, *23*(24), 7569-7583. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-2008

- Morrissey, M. A., Williamson, A. P., Steinbach, A. M., Roberts, E. W., Kern, N., Headley, M. B., & Vale, R. D. (2018). Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis. *Elife*, 7. doi:10.7554/eLife.36688
- Nelson, L. R., & Bulun, S. E. (2001). Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, 45(3 Suppl), S116-124.
- Network, N.-N. C. C. (2019). Thyroid Carcinoma - Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Retrieved from https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/thyroid.pdf
- Nicholson, L. B., Vlase, H., Graves, P., Nilsson, M., Molne, J., Huang, G. C., . . . Banga, J. P. (1996). Monoclonal antibodies to the human TSH receptor: epitope mapping and binding to the native receptor on the basolateral plasma membrane of thyroid follicular cells. *J Mol Endocrinol*, 16(2), 159-170.
- Nielsen, S. M., White, M. G., Hong, S., Aschebrook-Kilfoy, B., Kaplan, E. L., Angelos, P., . . . Grogan, R. H. (2016). The Breast–Thyroid Cancer Link: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(2), 231-238. doi:10.1158/1055-9965.epi-15-0833
- Oelsner, S., Waldmann, A., Billmeier, A., Roder, J., Lindner, A., Ullrich, E., . . . Wels, W. S. (2019). Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *Int J Cancer*. doi:10.1002/ijc.32269
- Pacini, F., Schlumberger, M., Dralle, H., Elisei, R., Smit, J. W. A., & Wiersinga, W. (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *154*(6), 787. doi:10.1530/eje.1.02158
- Park, J. R., Digiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., . . . Jensen, M. C. (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*, 15(4), 825-833. doi:10.1038/sj.mt.6300104
- Park, S., Shevlin, E., Vedvyas, Y., Zaman, M., Park, S., Hsu, Y. S., . . . Jin, M. M. (2017). Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci Rep*, 7(1), 14366. doi:10.1038/s41598-017-14749-3
- Park, T. S., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2011). Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol*, 29(11), 550-557. doi:10.1016/j.tibtech.2011.04.009
- Paschke, R., Lincke, T., Müller, S. P., Kreissl, M. C., Dralle, H., & Fassnacht, M. (2015). Therapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms. *Dtsch Arztebl International*, 112(26), 452-458. doi:10.3238/arztebl.2015.0452

- Pellegriti, G., Frasca, F., Regalbutto, C., Squatrito, S., & Vigneri, R. (2013). Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *Journal of cancer epidemiology*, 2013, 965212-965212. doi:10.1155/2013/965212
- Perez-Amill, L., Marzal, B., Urbano-Ispizua, A., Juan, M., & Martin-Antonio, B. (2018). CAR-T cell therapy, a door is open to find innumerable possibilities of treatments for cancer patients. *Turk J Haematol*. doi:10.4274/tjh.2018.0196
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 365(8), 725-733. doi:10.1056/NEJMoa1103849
- Promega. (2018). Caspase-Glo 3-7 Assay Protocol. Retrieved from <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?la=de-de>
- Rafiq, S., Purdon, T. J., Daniyan, A. F., Koneru, M., Dao, T., Liu, C., . . . Brentjens, R. J. (2017). Optimized T-cell receptor-mimic chimeric antigen receptor T cells directed toward the intracellular Wilms Tumor 1 antigen. *Leukemia*, 31(8), 1788-1797. doi:10.1038/leu.2016.373
- Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2002). Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 16, Unit 16.21. doi:10.1002/0471142727.mb1621s60
- Rathmell, J. C., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2000). In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell*, 6(3), 683-692.
- Ratner, M. (2016). Off-the-shelf CAR-T therapy induces remission in child with ALL. *Nat Biotechnol*, 34(1), 12. doi:10.1038/nbt0116-12
- Reiners, C., Hanscheid, H., Luster, M., Lassmann, M., & Verburg, F. A. (2011). Radioiodine for remnant ablation and therapy of metastatic disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(10), 589-595. doi:10.1038/nrendo.2011.134
- Riesco-Eizaguirre, G., Rodriguez, I., De la Vieja, A., Costamagna, E., Carrasco, N., Nistal, M., & Santisteban, P. (2009). The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res*, 69(21), 8317-8325. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-1248
- Robert Koch-Institut, Z. f. K. u. G. d. e. K. i. D. e. V. R. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014 - Schilddrüse. Retrieved from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c73_schilddruese.pdf?__blob=publicationFileRothmund, S.,

- Schumpelick. (2013). *Praxis der Viszeralchirurgie - Endokrine Chirurgie*, 3. Auflage. Springer Verlag.
- Rowe, C. W., Paul, J. W., Gedye, C., Tolosa, J. M., Bendinelli, C., McGrath, S., & Smith, R. (2017). Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *24*(6), R191. doi:10.1530/erc-17-0010
- Ruegemer, J. J., Hay, I. D., Bergstralh, E. J., Ryan, J. J., Offord, K. P., & Gorman, C. A. (1988). Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic variables. *J Clin Endocrinol Metab*, *67*(3), 501-508. doi:10.1210/jcem-67-3-501
- Saito, S., Nakazawa, Y., Sueki, A., Matsuda, K., Tanaka, M., Yanagisawa, R., . . . Koike, K. (2014). Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*, *16*(9), 1257-1269. doi:10.1016/j.jcyt.2014.05.022
- Samaan, N. A., Schultz, P. N., Haynie, T. P., & Ordonez, N. G. (1985). Pulmonary metastasis of differentiated thyroid carcinoma: treatment results in 101 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, *60*(2), 376-380. doi:10.1210/jcem-60-2-376
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L. J., Robinson, B., Brose, M. S., Elisei, R., . . . Sherman, S. I. (2015). Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med*, *372*(7), 621-630. doi:10.1056/NEJMoa1406470
- Shaha, A. R., Loree, T. R., & Shah, J. P. (1995). Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid. *Surgery*, *118*(6), 1131-1136; discussion 1136-1138.
- Shaha, A. R., Shah, J. P., & Loree, T. R. (1997). Differentiated thyroid cancer presenting initially with distant metastasis. *Am J Surg*, *174*(5), 474-476.
- Sherman, S. I. (2003). Thyroid carcinoma. *Lancet*, *361*(9356), 501-511.
- Spitzberg, C. (2016). Fortgeschrittenes Radiojod-refraktäres Schilddrüsenkarzinom - Diagnose und Therapie. *Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie - Endokrinologie Infomationen 2016, Sonderheft*.
- Straathof, K. C., Pule, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., . . . Rooney, C. M. (2005). An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, *105*(11), 4247-4254. doi:10.1182/blood-2004-11-4564
- Sugino, K., Ito, K., Jr., Ozaki, O., Mimura, T., Iwasaki, H., & Ito, K. (1998). Papillary microcarcinoma of the thyroid. *J Endocrinol Invest*, *21*(7), 445-448. doi:10.1007/bf03347324
- Suh, S., Pak, K., Seok, J. W., & Kim, I. J. (2016). Prognostic Value of Extranodal Extension in Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Yonsei Med J*, *57*(6), 1324-1328. doi:10.3349/ymj.2016.57.6.1324

- Tewari, K., Nakayama, Y., & Suresh, M. (2007). Role of direct effects of IFN-gamma on T cells in the regulation of CD8 T cell homeostasis. *J Immunol*, *179*(4), 2115-2125.
- Tielens, E. T., Sherman, S. I., Hruban, R. H., & Ladenson, P. W. (1994). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer*, *73*(2), 424-431.
- Treglia, G., Bertagna, F., Sadeghi, R., Verburg, F. A., Ceriani, L., & Giovanella, L. (2013). Focal thyroid incidental uptake detected by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. [Inzidenteller fokaler Schilddrüsen-Uptake in der ¹⁸F-Fluorodesoxyglukose-Positronenemissions tomographie]. *Nuklearmedizin*, *52*(04), 130-136. doi:10.3413/Nukmed-0568-13-03
- Tsurushita, N., Hinton, P. R., & Kumar, S. (2005). Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax. *Methods*, *36*(1), 69-83. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.007
- Tuttle, R. M., Ball, D. W., Byrd, D., Dilawari, R. A., Doherty, G. M., Duh, Q. Y., . . . Wirth, L. J. (2010). Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*, *8*(11), 1228-1274.
- V. Tiedje, S. T., H. Dralle, K. W. Schmid, D. Führer. (2015). Das medulläre Schilddrüsenkarzinom. *Der Internist*, *56*(9), 1019-1031. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00108-014-3638-z#citeas>
- van Heerden, J. A., Hay, I. D., Goellner, J. R., Salomao, D., Ebersold, J. R., Bergstralh, E. J., & Grant, C. S. (1992). Follicular thyroid carcinoma with capsular invasion alone: a nonthreatening malignancy. *Surgery*, *112*(6), 1130-1136; discussion 1136-1138.
- Verburg, F. A., Mäder, U., Reiners, C., & Hänscheid, H. (2014). Long-Term Survival in Differentiated Thyroid Cancer Is Worse After Low-Activity Initial Post-Surgical 131I Therapy in Both High- and Low-Risk Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *99*(12), 4487-4496. doi:10.1210/jc.2014-1631
- Verhoeven, E., Costa, C., & Cosset, F. L. (2009). Lentiviral vector gene transfer into human T cells. *Methods Mol Biol*, *506*, 97-114. doi:10.1007/978-1-59745-409-4_8
- Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2014). 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Rep*, *47*(3), 122-129.
- Viszeralchirurgie, D. G. f. A.-u. (2012). S2k Leitlinie: Operative Therapie maligner Schilddrüsenerkrankungen.
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker research*, *5*, 22-22. doi:10.1186/s40364-017-0102-y

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Das differenzierte Schilddrüsenkarzinom weist eine sehr gute Prognose auf. Dennoch gibt es Patienten, die refraktär auf die bereits etablierten Therapiemöglichkeiten der operativen Therapie, der Radioiodtherapie und der dauerhaften Thyreotropin-Suppression reagieren. Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) haben bereits vielversprechende Ergebnisse in der Therapie hämatookologischer Erkrankungen erzielt.

Ziel: Diese Arbeit evaluiert das Potential von CAR-T-Zellen, die gegen den Thyreotropin-Rezeptor gerichtet sind (anti-TSHR CAR-T-Zellen), gegen das differenzierte, TSHR-positive Schilddrüsenkarzinom.

Material und Methoden: Zielzellen sind die papilläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie K-1 und die follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133. Zur Beurteilung der Abtötung dieser Zellen durch anti-TSHR CAR-T-Zellen wird die Minderung der Zielzellen in Ko-Kultur unter dem Mikroskop, dem Fluoreszenzmikroskop (nach GFP-Markierung der Zielzellen) und mittels einer Caspase-3/7-Lumineszenz-Analyse untersucht.

Ergebnisse: Für K-1-Zellen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unspezifischen CAR-T-Zellen (T-Wert = 0,01), während anti-TSHR CAR-T-Zellen im Vergleich mit unmodifizierten T-Zellen die Signifikanz knapp verfehlen (T-Wert = 0,06). Für FTC-133 Zellen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen anti-TSHR CAR-T-Zellen und unmodifizierten T-Zellen (T-Wert = 0,02), während anti-TSHR CAR-T-Zellen im Vergleich mit unspezifischen CAR-T-Zellen die Signifikanz knapp verfehlen (T-Wert = 0,06) (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Fazit: Anti-TSHR CAR-T-Zellen stellen eine potentielle, neue Therapiemodalität zur Ablation gesunder und maligne transformierter Schilddrüsenzellen dar.

ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Background: Differentiated thyroid cancer presents with a very favourable prognosis. However, there are some cases with differentiated thyroid cancer that are refractory to the established treatment consisting of thyroidectomy, radioactive ¹³¹Iodide therapy and Thyrotropin-suppression. Chimeric antigen receptor T-cells (CART) have already shown impressive results in hematological cancers.

Objective: This study aims to evaluate the potential of CART targeting the Thyrotropin-receptor (anti-TSHR CART) against differentiated, TSHR-positive thyroid cancer.

Material and methods: Target cells are the papillary thyroid cancer cell line K-1 and the follicular thyroid cancer cell line FTC-133. The killing of target cells by anti-TSHR CART is measured as a reduction of target cells in co-culture under the microscope, the fluorescence microscope (after GFP-labelling) and with a caspase-3/7-luminescence analysis.

Results: With K-1 cells we could detect a significant difference between anti-TSHR CART and unspecific CART (T-value = 0.01), while anti-TSHR CART in comparison to unmodified T cells just missed significance (T-value = 0.06). With FTC-133 cells we could detect a significant difference between anti-TSHR CART and unmodified T cells (T-value = 0.02), while anti-TSHR CART in comparison to unspecific CART just missed significance (T-value = 0.06) (significance level $\alpha = 0.05$).

Conclusion: Anti-TSHR CART pose a potentially new treatment option to ablate healthy and malignant transformed thyroid cells expressing the Thyrotropin-receptor.

TABELLARISCHER LEBENSLAUF

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

In Aachen:

Al-Dahouk, Andereya, Andruszkow, Arbab, Bank, Bauerschlag, Baumann, Baumgartner, Becker, Behrendt, Behrens, Bernhagen, Bertram, Betsch, Betz, Beyer, Binnebösel, Blindt, Blum, Böhm, Boor, Bossinger, Bozkurt, Bozkurt, Brandenburg, Braunschweig, Brehmer, Brkovic, Brokmann, Brücken, Brukamp, Brümmendorf, Bruners, Bühren, Clarner, Claßen-Linke, Clusmann, Conze, Cornelissen, Cramer, Crysandt, Dafotakis, Damen, Detemple, Dienstknecht, Dietrich, Disselhorst-Klug, Dopychai, Dott, Dreher, Drescher, Duong Dinh, Dürrnagel, Eble, Effert, Eisert, El Bounkari, Enders, Ermis, Ernst, Falkenburger, Färber-Töller, Faridi, Floege, Forkmann, Förster, Franke, Frösch, Fröschchen-Behrens, Gaisa, Gaßler, Gauggel, Gobbele, Gradl, Greiner, Grieb, Groß, Grosse, Gründer, Gube, Haase, Hagenah, Hans, Hartmann, Haubrich, Häusler, Hausmann, Heddenhausen, Heidenreich, Heimann, Hein, Hepp, Hermanns-Sachweh, Hermel, Herpertz-Dahlmann, Hildebrand, Hilgers, Hoffmann, Höllig, Holy, Hölzle, Hornef, Horst, Hövels-Gürich, Huber, Hunold, Hutschenreuter, Ilgner, Imgrund, Isfort, Jahnen-Dechent, Jäkel, Johann, Jost, Junge, Kaldenhof, Kalka-Moll, Kämmerer-Gassler, Karges, Keil, Kemp, Kentrup, Kipp, Klemradt, Klink, Knobe, Knüchel-Clarke, Kobbe, Koch, Kokozidou, Kontny, Koschmieder, Kosinski, Krämer, Kraus, Krohn, Krusche, Kuckelkorn, Kuhl, Kühl, Kuhlmann, Kühn, Kunter, Kuth, Lampert, Lassay, Lepper, Leube, Lichte, Lindemann-Docter, Lorenzen, Lotfi, Lückhoff, Lüdde, Ludwig, Lüring, Lüscher, Mahnken, Martin, Marx, Mazinani, Megahed, Meinhold, Menon, Merk, Mertens, Merz, Meurer, Miltner, Mingers, Mischke, Möller, Möller-Hartmann, Mossdorf, Mottaghy, Moza, Mühlenbruch, Mühler, Mühlfeld, Mühlhoff, Mull, Müller, Müller-Newen, Müller-Rath, Mumme, Nacimiento, Najjari, Neis, Neulen, Neuloh, Neumann, Neuschaefer-Rube, Nguyen, Nowak, O'Dey, Ohnsorge, Orlikowsky, Otto, Özman, Pallua, Panse, Pappa, Park, Pauletzki, Pecks, Petermann-Meyer,

Peters, Pfister, Pinkawa, Piroth, Pishnamaz, Plange, Post, Prescher, Pufe, Purucker, Quack, Rath, Rauen, Reetz, Reich, Reinges, Reith, Remky, Rennekamp, Rink, Ritter, Rohrmann, Rössler, Rübben, Rudnik-Schöneborn, Salem, Savvidis, Schiefer, Schiwy-Bochat, Schlieper, Schmalzig, Schmeding, Schmid, Schmitz, Schnizler, Schoberer, Schöning, Schrage, Schubert, Schulz, Schulze, Schürmann, Schwarz, Sellei, Sellhaus, Shousha, Siewert, Skobel, Sohn, Spillner, Spreckelsen, Spüntrup, Steinau, Stollbrink, Streetz, Stromps, Strüwer, Südfeld, Tacke, Tenbrock, Teping, Tietze, Tillmann, Tingart, Tischendorf, Tometten, Trautwein, Trepels, Uciechowski, Uhlig, Ulmer, van der Linden, van Helden, Vazquez-Jimenez, Veeck, Verburg, Vernaleken, Vervoorts-Weber, von Felbert, Wagner, Walter, Wasmuth, Wein, Weinberger, Weis, Weishoff-Houben, Weiskirchen, Wenzl, Westhofen, Wiemuth, Wies, Wilhelm, Wilop, Windoffer, Witt, Wolff, Wölfler, Wruck, Yagmur, Zerres, Zilkens, zur Hausen

In Gainesville, Florida, USA:

Chang, Rivkees, Wendler

In Marburg:

Verburg

DANKSAGUNG

Ich möchte mich für all die unvergesslichen, anregenden und freundschaftlichen Begegnungen bedanken, die ich im Rahmen dieser Arbeit erfahren durfte.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med. Frederik A. Verburg (stellvertretender Klinikdirektor der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Gießen/Marburg). Ich danke ihm für seinen stets wohlwollenden Rat und die tatkräftige Bereitschaft mir ein Mentor zu sein. Ich weiß seine Bemühungen sehr zu schätzen.

Ich danke Prof. M.D. Scott A. Rivkees (Department of Pediatrics, University of Florida), in dessen Labor ich ein halbes Jahr lang mitwirken durfte. Ich kann mich glücklich schätzen durch ihn die Möglichkeit erhalten zu haben, an dem Forschungsprojekt um die anti-TSHR CAR-T-Zellen arbeiten zu dürfen. Durch seine Unterstützung erhielt ich die Einladung, dieses Projekt auf dem Pediatric Academic Society Meeting (PAS) 2016 in Baltimore, Maryland, USA, vorzustellen.

Ebenso danke ich dem restlichen Team von Prof. Rivkees Labor für die sehr angenehme Zusammenarbeit. Namentlich möchte ich Ph.D. Christopher C. Wendler, Ph.D. Xiefan Fang und Ryan R. Poulsen erwähnen. Ein besonderer Dank gilt Ph.D. Hazel C. Levy und Wendy Zhang.

Prof. Ph.D. Lung-Ji Chang (Department of Molecular Genetics & Microbiology, University of Florida) und Ph.D. Jin-Yuan Ho (Chang Gung University, Taiwan; ehemals beschäftigt im Department of Molecular Genetics & Microbiology, University of Florida) möchte ich für ihre Kooperation an der Entwicklung der anti-TSHR CAR-T-Zellen danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Hermann und Brigitte Weyers sowie meinem Ehemann Bastian Spieker von Herzen danken!

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „CAR-T-Zellen erkennen und eliminieren den Thyreotropin-Rezeptor exprimierende differenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen“ in der Klinik für Nuklearmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. med. Frederik A. Verburg mit Unterstützung durch Prof. M.D. Scott A. Rivkees (Department of Pediatrics, University of Florida, Gainesville, FL, USA) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer