

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation
Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

Präklinische Entwicklung adoptiver Immuntherapien für Typ-I-Allergien auf Basis chimärer Antigenrezeptoren (CARs) gegen IgE-positive B-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sophia Marlene Cichutek
aus Frankfurt am Main

Hamburg, 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.01.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Johanna Brandner

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Kristoffer Riecken

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Allergien und Rolle des IgE bei Typ-I-Allergien | 7 |
| 1.2 | Therapie des IgE-vermittelten allergischen Asthmas | 8 |
| 1.3 | Produktion und Regulation des IgE durch B-Zellen | 9 |
| 1.4 | Die extrazelluläre Membran-proximale Domäne des IgE-B-Zell-Rezeptors | 13 |
| 1.5 | Die EMPD als Zielantigen in der Therapie allergischer Erkrankungen | 15 |
| 1.6 | CAR-T-Zelltherapie | 17 |
| 1.7 | Das Prinzip der chimären Antigenrezeptoren | 19 |
| 2 | Fragestellung | 22 |
| 3 | Material und Methoden | 24 |
| 3.1 | Material | 24 |
| 3.1.1 | Primer | 24 |
| 3.1.2 | Sequenzen | 24 |
| 3.1.3 | Plasmide und DNA-Fragmente | 25 |
| 3.1.4 | Antikörper | 26 |
| 3.1.5 | Zelllinien | 27 |
| 3.1.6 | Zellkulturmedien | 27 |
| 3.2 | Methoden | 28 |
| 3.2.1 | Kultivierung von humanen Zelllinien | 28 |
| 3.2.2 | Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus einer Blutprobe | 28 |
| 3.2.3 | Stimulation und Expansion von primären humanen T-Zellen | 29 |
| 3.2.4 | Konstruktion der gammaretroviralen CAR-kodierenden Vektoren | 29 |
| 3.2.5 | Herstellung lentiviraler und gammaretroviraler Vektorpartikel in HEK-293T-Zellen | 30 |
| 3.2.6 | Gammaretrovirale Transduktion von NK-92 ^{CD38^{-/-}} -Effektorzellen und primären T-Zellen zur Expression der CAR-Konstrukte | 31 |
| 3.2.7 | Transduktion der Zielzelllinien mit den Reportergen Luciferase und eGFP | 31 |
| 3.2.8 | Transduktion der Ramos-Zielzellen mit der cDNA zur Expression von membranständigem IgE | 32 |
| 3.2.9 | Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen zur Charakterisierung der Zielzelllinien | 33 |
| 3.2.10 | Durchflusszytometrisches Sortieren von Zellen | 34 |
| 3.2.11 | Lumineszenz-basiertes Zytotoxizitätsassay | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | Ergebnisse | 36 |
| 4.1 | Entwicklung einer idealen Testumgebung mit Zielantigen-exprimierenden Zelllinien | 37 |
| 4.1.1 | Nachweis der stabilen Expression von eGFP- und Luciferase-Gen in LeGO-iG2-Puro ⁺ -Luc2-transduzierten U266- und Ramos-Zellen | 37 |
| 4.1.2 | Stabile Oberflächenexpression der schweren Kette von membranständigem IgE auf Ramos-Zellen | 39 |
| 4.1.3 | Charakterisierung der Zielzellen | 42 |
| 4.1.4 | Konstruktion eines EMPD-spezifischen Antikörpers und Nachweis der EMPD-Oberflächenexpression auf Zielzellen | 43 |
| 4.2 | Genetische Modifikation von primären T-Zellen und NK-92-Zellen zur Expression der CAR | 48 |
| 4.2.1 | Herstellung gammaretroviraler Vektoren mit EMPD-spezifischen CAR | 48 |
| 4.2.2 | Stabile retrovirale Transduktion von primären T-Zellen mit CAR-kodierenden Vektoren und Nachweis der Expression der CAR-Konstrukte | 51 |
| 4.2.3 | Stabile retrovirale Transduktion von NK-92 ^{CD38^{-/-}} -Zellen mit CAR-kodierenden Vektoren und indirekter Nachweis der CAR-Expression | 54 |
| 4.3 | Vergleichende <i>In-vitro</i>-Zytotoxizitätsassays der EMPD-spezifischen CAR | 58 |
| 4.3.1 | Zytotoxizitätsassay mit primären humanen CAR-T-Zellen und Ramos ^{luc/GFP-hemL} -Zellen | 59 |
| 4.3.2 | Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden primären T-Zellen und EMPD-hochpositiven Ramos ^{luc/GFP-hemL} -Zellen | 61 |
| 4.3.3 | Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden NK-92 ^{CD38^{-/-}} -Zellen und EMPD-hochpositiven Ramos ^{luc/GFP-hemL} -Zellen | 66 |
| 4.3.4 | Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden NK-92 ^{CD38^{-/-}} -Zellen gerichtet gegen Ramos ^{luc/GFP-hemL} -Zellen mit unterschiedlich hohen EMPD-Expressionsniveaus | 68 |
| 4.3.5 | Vergleichende Zytotoxizitätsassays mit NK-92 ^{CD38^{-/-}} -Zellen mit CAR mit unterschiedlicher Spacerlänge zwischen Transmembrandomäne und Bindedomäne | 70 |
| 5 | Diskussion | 72 |
| 5.1 | Erfolgreiche Konstruktion EMPD-spezifischer CAR und Herstellung von humanen CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen | 72 |
| 5.2 | Spezifische Zytotoxizität EMPD-gerichteter CAR-T-Zellen und CAR-NK-92-Zellen <i>in vitro</i> | 75 |

| | |
|--|------------|
| 5.3 Bindungseigenschaften und Optimierung der Effektivität und Wirksamkeit von CAR-Effektorzellen | 77 |
| 5.3.1 Spezifische Erkennung der EMPD durch die Bindedomäne im CAR | 77 |
| 5.3.2 Einfluss der Spacerlänge auf die CAR-vermittelte zytotoxische Aktivität | 81 |
| 5.4 Neuartige Therapie allergischer Erkrankungen mit CAR-Immunzellen | 82 |
| 5.5 Ausblick | 87 |
| 6 Zusammenfassung | 90 |
| 7 Abkürzungsverzeichnis | 92 |
| 8 Literaturverzeichnis | 95 |
| 9 Danksagung | 104 |
| 10 Lebenslauf | 105 |
| 11 Eidesstattliche Erklärung | 106 |

1 Einleitung

1.1 Allergien und Rolle des IgE bei Typ-I-Allergien

Allergien sind eine Volkskrankheit, in den westlichen Ländern hat sich die Zahl der Allergiker in den letzten Jahrzehnten mehr als verdoppelt, bei weiter steigender Tendenz. In Deutschland sind mehr als 30 % der Erwachsenen in ihrem Leben von einer allergischen Erkrankung betroffen (Bergmann et al. 2016). Die Typ-I-Allergie ist die weitaus häufigste Form der Allergie und zeigt sich unter anderem als Heuschnupfen (allergische Rhinokonjunktivitis), allergisches Asthma, atopische Dermatitis oder Nahrungsmittel- und Tierhaarallergie. Die klinischen Symptome und deren Ausprägung sind vielseitig und können sich im Rahmen einer allergischen Reaktion an Atemwegen, Haut, Gastrointestinaltrakt und dem kardiovaskulären System manifestieren. Klinisch kann dies mit lokalen allergischen Entzündungsreaktionen in Form von Juckreiz, Urtikaria, Ödemen oder Rötungen, aber auch mit schweren, systemischen Reaktionen mit Ausprägung an Schleimhäuten und dem Bronchialsystem einhergehen. Bei schwerwiegenden Verläufen kann eine Allergie einen lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock mit Herz-Kreislaufversagen zur Folge haben (Coombs 1968).

Der pathophysiologische Hintergrund einer Allergie ist eine überschießende Immunreaktion auf externe, normalerweise harmlose Antigene, die Allergene. Der Allergie kann dabei eine spezifische Überempfindlichkeit gegenüber Allergenen aus z.B. Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaaren, Insektengiften, Nahrungsbestandteilen und Arzneimitteln oder eine unspezifische Hyperreagibilität zu Grunde liegen. Immunglobulin E (IgE) spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Typ-I-Allergie (Coombs 1968). Die Produktion der IgE-Antikörper erfolgt durch eine fehlgeleitete Aktivierung von Immunzellen nach Kontakt mit dem Allergen. Diese ins Blut sezernierten allergenspezifischen IgE-Moleküle binden dann mit ihrem Fc-Teil an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen werden durch die Bindung der an sich harmlosen, allergenen Antigene die an den IgE-Rezeptor gebundenen IgE-Moleküle auf den Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten quervernetzt und führen zur Aktivierung und Degranulation der Zellen und Freisetzung von Histamin und weiteren Entzündungsmediatoren (Valenta 2002). Folglich wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die die typische Allergiesymptomatik innerhalb von Minuten verursacht.

Obwohl bei milden bis moderaten allergischen Reaktionen eine Besserung der Symptome therapeutisch mit Antihistaminika und Glucocorticoiden erzielt wird, bleiben diese bei schweren Verläufen häufig medikamentös unzureichend kontrolliert. Die Serumkonzentration des allergenspezifischen IgE sowie der Anteil des allergenspezifischen IgE an der Gesamt-IgE-Konzentration korrelieren dabei mit der klinischen Ausprägung (Celik-Bilgili et al. 2005, Benhamou et al. 2008, Rolinck-Werninghaus et al. 2008). IgE stellt daher ein attraktives Ziel in der Therapie von schweren allergischen Erkrankungen dar.

1.2 Therapie des IgE-vermittelten allergischen Asthmas

Der IgE-spezifische monoklonale Antikörper (mAb) *Omalizumab* ist seit mehr als 10 Jahren für die Therapie des allergischen Asthmas und der IgE-vermittelten chronischen spontanen Urtikaria zugelassen. In klinischen Prüfungen hat sich *Omalizumab* als wirksam und gut verträglich erwiesen (Buhl et al. 2002, Holgate et al. 2004). Im Rahmen der INNOVATE-Studie von Humbert *et al.* (Humbert et al. 2005) erhielten Patienten mit schwerem allergischem Asthma *Omalizumab* über 28 Wochen zusätzlich zur Standardtherapie mit β_2 -Sympathomimetika und inhalativen Hochdosis-Glucocorticoiden. Hierunter sank die Anzahl an schweren Asthma-Exazerbationen bei den mit *Omalizumab* behandelten Patienten um 50 %. Von den mit *Omalizumab* behandelten Patienten entwickelten 24 % eine schwere Exazerbation, während 48 % in der Placebo-Gruppe diese entwickelten. Zugleich zeigten sich unter dem Einfluss von *Omalizumab* signifikante Besserungen der Symptomatik und der Lebensqualität.

Die spezifische Bindung von *Omalizumab* an IgE inhibiert die Bindung von IgE an den Fc ϵ RI-Rezeptor der Mastzellen und basophilen Granulozyten und verhindert so die Ausbildung der IgE-vermittelten allergischen Entzündungsreaktion (Holgate et al. 2005). Dabei bindet der gegen IgE gerichtete Antikörper freies, lösliches IgE und nicht das an Fc ϵ RI-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebundene IgE. Eine Aktivierung der Mastzellen durch *Omalizumab* wird so verhindert. Die IgE/Anti-IgE-Komplexe werden durch das durch das retikuloendotheliale System in der Leber und Endothelzellen abgebaut. Die Therapie mit *Omalizumab* führt so zu einem schnellen Abfall des IgE-Spiegels im Serum sowie im späteren Verlauf zur Herunterregulation der Expression von Fc ϵ RI-Rezeptoren, bedingt durch die niedrigen

Serum-IgE-Spiegel (Chang 2000, Chang et al. 2007). Die Wirksamkeit von *Omalizumab* zeigt die Bedeutung von IgE als wirksamem therapeutischem Target für die Behandlung von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. Aufgrund der Halbwertszeit von ein bis vier Wochen erfordert die Therapie mit *Omalizumab* jedoch eine regelmäßige Gabe des Medikaments in Abständen von vier Wochen. Eine Unterbrechung der Therapie mit *Omalizumab* führt zu erneut hohen Serum-IgE-Spiegel und dem Wiederauftreten der Symptome (Liour et al. 2016, Stand Juli 2020). Des Weiteren ist die Therapie mit *Omalizumab* nur für Patienten mit Serum-IgE-Spiegel unter 700 IE/ml zugelassen, Patienten mit hohem Serum-IgE-Spiegel sind von der Therapie ausgeschlossen, benötigen jedoch umso dringender eine den Serum-IgE-Spiegel-senkende Therapie. Ein therapeutischer Ansatz, der dagegen auf der Hemmung der Produktion von IgE beruht, könnte die Serum-IgE-Spiegel dauerhaft senken und zu einer langfristigen Kontrolle der IgE-vermittelten allergischen Erkrankung führen.

1.3 Produktion und Regulation des IgE durch B-Zellen

Die Produktion der IgE-Antikörper wird bei einer Typ-I-Allergie nach dem ersten Allergenkontakt gebahnt, ein Mechanismus, der Sensibilisierung genannt wird. Im Unterschied zu gesunden Patienten dominiert bei Allergikern infolge eines Kontakts mit dem Allergen als fremdem Antigen eine durch Typ 2-T-Helfer-(T_H2)-Zellen gesteuerte Immunantwort gegenüber einer T_H1-vermittelten Immunantwort bei Nicht-Allergikern. Beim *Priming* wird das Allergie-definierende Antigen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und über MHC-Klasse II-Moleküle an der Zelloberfläche gegenüber antigenspezifischen B-Zellen sowie naiven CD4⁺-T_H-Zellen präsentiert. Dies bedingt die Ausbildung einer verstärkten Reizantwort auf die nach Erstkontakt mit Aktivierung von Immunzellen folgende erneute Allergenexposition.

Zunächst wird die B-Zelle durch Bindung des Antigens an ihren allergenspezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR) zur Aktivierung angeregt. Der spezifische BCR wird von B-Zellen während der verschiedenen Stadien der Reifung exprimiert, nimmt dabei eine zentrale Rolle bei der Differenzierung zu IgE-positiven Plasmazellen ein und ist grundlegend an der Regulation der Produktion von löslichem IgE beteiligt (Achatz et al. 1997). Der BCR besteht in seinem Aufbau aus einer membranständigen Form eines Immunglobulins und einem nicht-kovalent assoziierten I α / β -Heterodimer, das der

Signaltransduktion zur Aktivierung der B-Zelle bei Antigenbindung dient. Die Zusammenlagerung mit den akzessorischen Proteinen ist zudem für die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche erforderlich. Die lösliche Form dieses Ig mit derselben Antigen-spezifität ist der Antikörper, der nach Aktivierung der B-Zelle über den BCR durch die ausdifferenzierten B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen sezerniert wird (Murphy K. 2018). Abhängig von ihrem Differenzierungsstadium exprimieren B-Zellen unterschiedliche Isotypklassen von membranständigen Ig. Unreife B-Zellen tragen zunächst einen IgM-BCR, während IgM und IgD zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung koexprimiert werden können. Nach dem Isotypwechsel exprimieren B-Zellen entweder IgG-, IgA- oder IgE-BCR. Die Bindung des BCR an ein Antigen stimuliert die BCR-tragende Zelle dann zur Proliferation und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen (Murphy K. 2018).

Mehrere Studien bestätigen die Bedeutung des IgE-BCR für die IgE-vermittelte Immunantwort der Typ-I-Allergie. In transgenen Mäusen, bei denen eine Deletion der Transmembranen und der zytoplasmatischen Domäne des IgE-BCR vorlag und denen daher eine Oberflächenexpression des IgE-BCR fehlte, war die IgE-Produktion negativ beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die IgE-Produktion der aktivierten B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen eine intakte IgE-BCR-Signalübertragung erfordert (Achatz, Nitschke et al. 1997). Zur effektiven Aktivierung der B-Zelle ist neben der Stimulierung über den BCR eine Interaktion mit antigenspezifischen T_H -Zellen notwendig. Das *Priming* durch die antigenpräsentierende Zelle begünstigt aus bisher ungeklärten Gründen die Differenzierung von naiven T_H -Zellen zu T_H2 -Zellen. Über direkte T-Zell/B-Zell-Interaktion sowie über die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-13 wird so eine Aktivierung der allergenspezifischen B-Zellen verstärkt und die B-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung zu zunächst Plasmablasten und im Verlauf zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen angeregt (Murphy K. 2018). Die von den T_H2 -Zellen sezernierten Zytokine verstärken die Typ 2-Immunantwort und stimulieren den Isotypwechsel der B-Zellen zur Produktion von IgE.

In der frühen Phase der Sensibilisierung nach erstem Allergenkontakt differenzieren sich aktivierte B-Zellen zu kurzlebigen Plasmablasten aus, einer unreifen Vorstufe der Plasmazellen, die eine Lebensdauer von drei bis vier Tagen besitzen (Smith et al. 1996). Plasmablasten sind antikörpersezernierende Zellen, die noch keine somatische Hypermutation der variablen Antikörperregionen zur Affinitätsreifung und keinen

Isotypwechsel durchlaufen haben, und exprimieren bzw. sezernieren daher Immunglobuline vom Typ M (IgM). IgM-Antikörper besitzen zunächst nur eine geringe Affinität gegenüber dem Antigen und vermitteln die frühe Immunantwort. Erst in einer späteren Phase der Sensibilisierung durchlaufen die aktivierten B-Zellen einen Isotypwechsel ihres BCR von IgM zu IgE. Dieser Isotypwechsel kann entweder über die Zwischenstufe IgG1 (sequentieller Isotypwechsel) oder direkt zu IgE erfolgen (Abb. 1). Dadurch verändert sich die Effektoraktivität des Antikörpers, nicht aber seine Antigenspezifität (Wu und Zarrin 2014). He *et al.* (He et al. 2013) und Xiong *et al.* (Xiong et al. 2012) nehmen aufgrund von Untersuchungen an IgE-Reporter-Mäusen an, dass ein direkter Isotypwechsel zu IgE die Bildung von niedrigaffinen IgE-Antikörpern durch Plasmazellen vermittelt, wohingegen ein sequentieller Isotypwechsel zur Bildung von hochaffinen IgE-Antikörpern durch Plasmazellen führt.

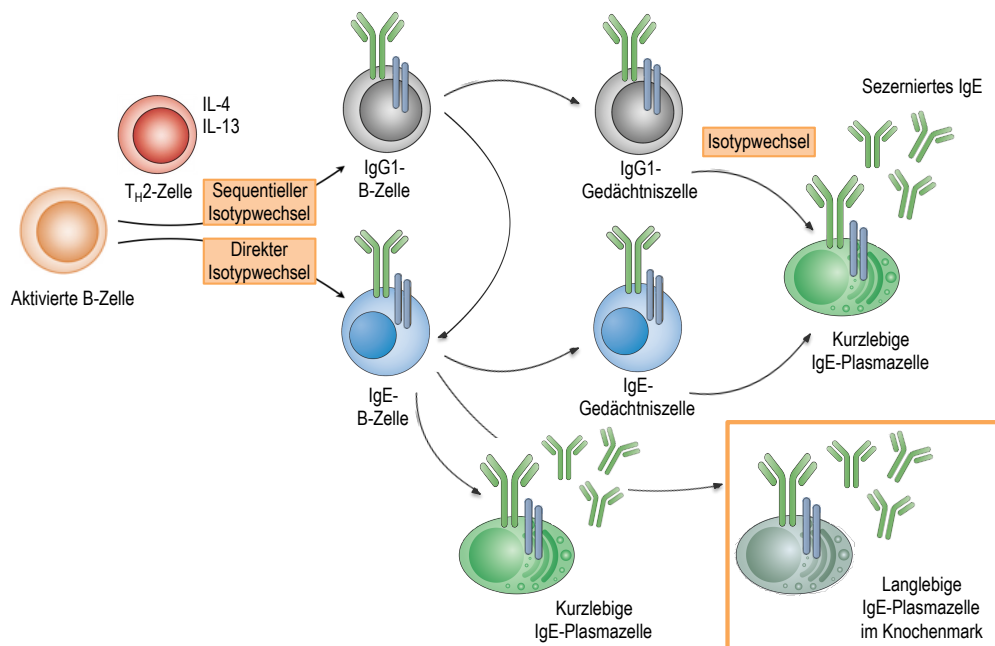


Abb. 1: Darstellung der Produktion und Regulation von IgE durch B-Zellen und Plasmazellen nach Isotypwechsel. Die Aktivierung der allergenspezifischen B-Zellen wird über die Interaktion mit T_H2-Zellen sowie über die Zytokine IL-4 und IL-13 verstärkt und regt die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen und langlebigen, ruhenden B-Gedächtniszellen an. Dabei durchlaufen sie einen direkten oder sequentiellen Isotypwechsel über IgG1 zu IgE. IgE-B-Zellen akkumulieren somatische Mutationen, erfahren eine Affinitätsreifung und differenzieren sich meist zu kurzlebigen IgE-produzierenden Plasmazellen. Einige IgE-B-Zellen differenzieren sich jedoch zu langlebigen IgE-Plasmazellen, die in das Knochenmark wandern. Zusammen mit IgG1-B-Gedächtniszellen, die nach erneuter Begegnung mit dem Antigen einen sekundären Isotypwechsel zu IgE durchlaufen, tragen die IgE-B-Gedächtniszellen zum immunologischen Gedächtnis bei (Wu und Zarrin 2014, modifiziert).

Die Mehrzahl dieser Plasmazellen besitzt eine kurze Lebensdauer von wenigen Wochen und bewirkt somit keine anhaltende IgE-Immunantwort. Daher wird vermutet, dass ebenfalls eine geringe Anzahl an langlebigen IgE-sezernierenden Plasmazellen gebildet wird, die sich im Knochenmark befinden und zu einer anhaltenden IgE-Produktion mit erhöhtem Serum-IgE-Spiegel im Vergleich zu gesunden Patienten beitragen (Wu und Zarrin 2014). Es sind einzelne Fälle bekannt, bei denen Patienten ohne bekannte Allergie nach einer allogenen Knochenmarktransplantation von einem allergischen Spender eine dem Spender entsprechende allergenspezifische und IgE-vermittelte allergische Erkrankung entwickelt haben. Dies bekräftigt die Hypothese, dass langlebige IgE-sezernierende Plasmazellen im Knochenmark existieren (Bellou et al. 1997, Hallstrand et al. 2004). Jedoch ist bisher unklar, ob allein langlebige Plasmazellen und B-Gedächtniszellen für den Transfer einer Allergie im Rahmen einer Knochenmarktransplantation verantwortlich sind (Eckl-Dorna und Niederberger 2013). Denn neben diesen langlebigen Plasmazellen können zudem ruhende B-Gedächtniszellen zum immunologischen Gedächtnis beitragen. B-Gedächtniszellen proliferieren nicht und bilden keine löslichen Antikörper. Bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen bedingen sie durch Reaktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen eine schnellere und stärkere IgE-vermittelte Entzündungsreaktion. Dabei weisen ihr IgE-BCR und die von ihnen sezernierten IgE-Antikörper höhere Affinitäten für das Antigen auf als jene von naiven B-Zellen. *In-vivo*-Untersuchungen an IgE-Reporter-Mäusen weisen darauf hin, dass der Großteil des Serum-IgE in Mäusen von kurzlebigen IgE-Plasmazellen und zu einem geringen Anteil von langlebigen IgE-Plasmazellen produziert wird, während IgG1- und IgE-B-Gedächtniszellen als potenzielle Quelle des IgE-Gedächtnisses identifiziert wurden (Wu und Scheerens 2014).

Das immunologische Gedächtnis der IgE-vermittelten Entzündungsreaktion ist bislang nicht vollständig erforscht und die Entstehung des IgE-Gedächtnisses ist umstritten. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass IgE-exprimierende B-Zellen und Plasmazellen in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vorkommen und eine relativ kurze Lebensdauer haben. Das dargestellte Modell der IgE-Produktion und des IgE-basierten immunologischen Gedächtnisses legt nahe, dass ein signifikanter Anteil des Serum-IgE durch fortlaufende Aktivierung und Differenzierung von naiven B-Zellen und B-Gedächtniszellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen gebildet wird. Weiter

impliziert es, dass der Serum-IgE-Spiegel durch Hemmung der Ausbildung neuer Zellen signifikant verringert werden könnte, beispielsweise durch direktes Targeting von IgE-positiven B-Zellen, indem IgE-positive B-Zellen als Zielstruktur in therapeutischen Ansätzen verwendet werden. Darüber hinaus lässt dieses Modell vermuten, dass ein signifikanter Anteil des Langzeit-IgE-Gedächtnisses durch Eliminierung von IgE-positiven B-Gedächtniszellen gelöscht werden könnte, auch wenn die IgG1-B-Gedächtniszellen, die ebenfalls zum IgE-Gedächtnis beitragen, von diesem Ansatz nicht betroffen wären (Saunders et al. 2019, Schmitt et al. 2020). Eine Therapie, die das Ziel hat, den gemeinsamen Ursprung der IgE-Produktion, die IgE-BCR-exprimierenden und IgE-sezernierenden Zellen, zu eliminieren, hätte das Potenzial, eine langanhaltende Reduktion von löslichem IgE im Serum zu erreichen.

1.4 Die extrazelluläre Membran-proximale Domäne des IgE-B-Zell-Rezeptors

IgE existiert in zwei Formen, einer membranständigen Form (mIgE), die auf der Zelloberfläche von B-Zellen nach Isotypwechsel zu IgE und somit auf allen IgE-produzierenden B-Zellen exprimiert wird, und einer löslichen Form des IgE (sIgE), die von IgE-positiven Plasmablasten und Plasmazellen sezerniert wird. mIgE ist Teil des IgE-BCR und für die Herausbildung der IgE-vermittelten Immunreaktion unerlässlich. Die Expression von mIgE während der verschiedenen Differenzierungsstadien ist für die anschließende Produktion löslicher IgE-Antikörper entscheidend. Eine defekte Expression des mIgE führte *in vivo* in transgenen Mäusen zu einem fast vollständigen Mangel an löslichem IgE im Serum (Achatz, Nitschke et al. 1997). Strukturell bestehen beide Formen des IgE, mIgE und sIgE, aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L), der konstanten Domäne der leichten Kette und vier konstanten Domänen der schweren Kette (C_{H1} - C_{H4}) eines Immunglobulins. Sie unterscheiden sich nur durch ein Peptidsegment am C-Terminus der schweren Kette des mIgE, welches unter anderem den transmembranen Teil des Immunglobulins in der Zellmembran darstellt. Dieses Segment des mIgE besteht neben der Transmembrandomäne aus einer intrazellulären Domäne, die an der Signalübertragung des BCR beteiligt ist und zusätzlich aus der extrazellulären Membran-proximalen Domäne (EMPD) (Davis et al. 1991). Die EMPD stellt damit ein bedeutsames Epitop dar, das ausschließlich auf mIgE, nicht aber auf sIgE vorhanden ist. Aus diesem Grund

eignen sich Epitope der EMPD als Zielstruktur, um die Population von IgE-exprimierenden B-Zellen, die die verschiedenen Differenzierungsstadien von B-Zellen umfasst, von den unreifen Vorläufer-B-Zellen bis zu B-Gedächtniszellen und Plasmazellen, therapeutisch als Ziel zu erfassen (Chowdhury et al. 2012).

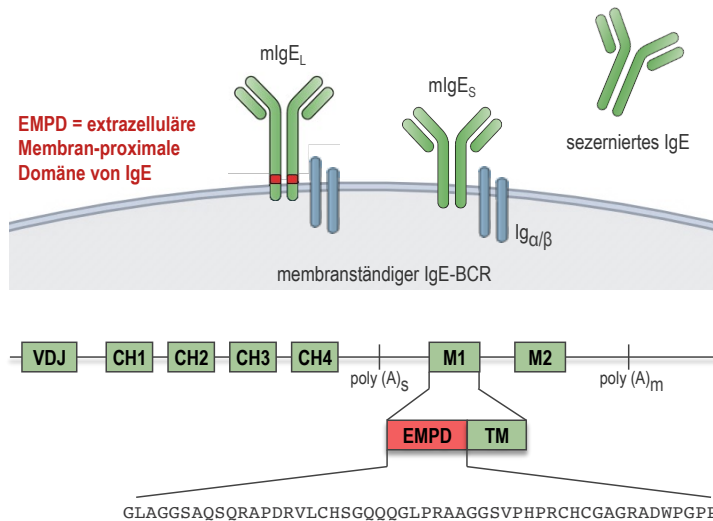


Abb. 2: Varianten des membranständigen IgE und sezerniertes lösliches IgE. IgE wird als membranständige Form als Teil des B-Zellrezeptors (mIgE) und als sezernierte Form (sIgE) von B-Zellen exprimiert. Die schwere Kette des mIgE kann dabei in zwei Isoformen vorkommen, einer langen Isoform (mIgE_L), die zusätzlich eine extrazelluläre Membran-proximale Domäne (EMPD) enthält, und einer kurzen Isoform (mIgE_S) ohne diese EMPD. mIgE wird kodiert durch die Exons der variablen Gensegmente (VDJ) und der vier konstanten Domänen der schweren Ig-Kette (C_{H1}-C_{H4}), der Transmembrandomäne (M1) und der intrazellulären Domäne (M2). Die EMPD ist Bestandteil von M1 und umfasst 52 Aminosäuren, sie ragt auf der Zelloberfläche aus der Zellmembran heraus und ist daher zugänglich. Die Polyadenylierungsstellen für sezerniertes IgE (poly (A)_s) ist zwischen dem CH4 und dem M1-Exon lokalisiert, während die Polyadenylierungsstelle für membranständiges IgE (poly (A)_m) dem M2-Exon in 3'-Richtung nachgeschaltet ist. Oben links: membranständiger IgE-B-Zellrezeptor mit EMPD; oben Mitte: membranständiger IgE-B-Zellrezeptor ohne EMPD; oben rechts: sezerniertes IgE; unten: schematische Darstellung der für mIgE_L kodierenden Genabschnitte (Cambier et al. 2007, modifiziert, Feichtner et al. 2008)

Auf mIgE-exprimierenden B-Zellen existiert die schwere Kette des mIgE überwiegend in der langen Isoform (mIgE_L), die die extrazelluläre Membran-proximale Domäne (EMPD) von 52 Aminosäuren zwischen der C_{H4}-Domäne und der C-terminalen Transmembrandomäne enthält (Peng et al. 1992, Zhang et al. 1992). Der schweren Kette der kurzen Isoform von mIgE (mIgE_S) fehlt die EMPD. Die zwei verschiedenen Isoformen des mIgE werden durch alternatives Spleißen des mRNA-Transkripts

generiert (Abb. 2). Beide Isoformen bilden funktionale IgE-BCR an Zelloberfläche von B-Zellen. Peng *et al.* (Peng, Davis et al. 1992) und Zhang *et al.* (Zhang, Saxon et al. 1992) konnten eine Expression der langen mIgE_L-Isoform überwiegend auf primären B-Zellen und humanen IgE-exprimierenden Myelomzellen nachweisen, während die kurze mIgE_S-Isoform sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in geringen oder nicht nachweisbaren Mengen vorlag. Andere Experimente zeigten, dass die EMPD-tragende lange mIgE_L-Isoform vorwiegend auf B-Zellen direkt nach Isotypwechsel zu IgE exprimiert wird, während die EMPD-defiziente kurze Isoform vorwiegend von differenzierteren Plasmablasten-ähnlichen Zellen exprimiert wird (Ramadani et al. 2017, Engels und Wienands 2018). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression der jeweiligen mIgE-Isoform vom Stadium der B-Zell-Differenzierung abhängt und die Produktion von IgE-Antikörpern beeinflussen und regulieren könnte.

1.5 Die EMPD als Zielantigen in der Therapie allergischer Erkrankungen

Um IgE-BCR-exprimierende und folglich IgE-sezernierenden Zellen mittels mAb zu eliminieren, kann die EMPD als spezifische Zielstruktur dienen, da sie ausschließlich im mIgE_L, nicht jedoch im sIgE gefunden wird. Der Vorteil gegenüber IgE-spezifischen Antikörpern, die eine Domäne des IgE binden, die ebenfalls auf sIgE vorhanden ist, wäre, dass eine Bindung an sIgE-Moleküle, die an FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen gebunden sind, verhindert wird. Dies hätte eine verstärkte Aktivierung der Mastzellen und Auslösung einer Entzündungsreaktion zur Folge. Chen *et al.* (Chen et al. 2002) entwickelten den EMPD-spezifischen mAb a20, der gegen ein C-terminal befindliches Epitop (P3-Peptid) gerichtet ist. Sie konnten zeigen, dass dieser mAb in der Lage ist, eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität gegenüber mIgE_L-exprimierenden Zellen zu induzieren. Weitere durch Chen *et al.* (Chen, Liu et al. 2002) entwickelte EMPD-spezifische mAb vermittelten darüber hinaus eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegenüber mIgE_L-exprimierenden Zellen. Der mAb 4b12, beispielsweise, erkennt ein Epitop des N-terminalen Teils der EMPD (P1-Peptid) und mAb 26H2 das sich mittig befindliche P2-Peptid. Beide zeigten im Vergleich mit C-terminal bindenden mAb eine erhöhte Bindungskapazität gegenüber der EMPD (Chen et al. 2010). Die Ergebnisse von Chen *et al.* (Chen, Liu et al. 2002) legen nahe, dass die entwickelten EMPD-spezifischen mAb 4b12 und 26H2 über Bindung und Aktivierung

des IgE-BCR die Apoptose der mIgE_L-exprimierenden B-Zellen induzieren oder eine ADCC-vermittelte Lyse der mIgE_L-exprimierenden B-Zellen erfolgt. Wenn im Ergebnis auf diese Weise die Bildung von mIgE_L-tragenden Plasmazellen durch einen EMPD-spezifischen mAb inhibiert wird, wird folglich die Synthese von IgE durch neu gebildete Plasmazellen unterbrochen. Da die vorhandenen IgE-sezernierenden kurzlebigen Plasmazellen nach einer gewissen Zeit absterben, sollte eine Therapie mit EMPD-spezifischen mAb bei allergischen Patienten zu einer langfristigen Abschwächung der IgE-Synthese und im besten Fall zurück in einen desensibilisierten Zustand führen. Derzeit wird die Effektivität des mAb 4b12 im Rahmen einer präklinischen Studie mit Blut von Patienten mit Urtikaria oder atopischer Dermatitis und hohem Serum-IgE-Spiegel getestet, um die Auswirkungen einer Gabe von 4b12, *Omalizumab* bzw. *Rituximab* vergleichend auf die Unterdrückung der IgE-Produktion und die Anzahl von IgE-produzierenden Plasmazellen im Serum zu untersuchen (NCT01995747, <https://clinicaltrials.gov>).

Quilizumab, ein humanisierter EMPD-spezifischer mAb, wurde von dem murinen EMPD-spezifischen mAb h47H4 abgeleitet (Brightbill et al. 2010). Die Wirkung von *Quilizumab* auf die IgE-Produktion wurde in drei unabhängigen klinischen Prüfungen der Phase I bzw. II zur Behandlung von Patienten mit allergischem Asthma untersucht (NCT01582503, <https://clinicaltrials.gov>). *Quilizumab* erwies sich als gut verträglich und reduzierte den Serum-IgE-Spiegel um 30-40 % nach 36 Wochen der Therapie. Bei Patienten mit leichtem Asthma führte die Behandlung mit *Quilizumab* zu einer Hemmung der allergenspezifischen IgE-Produktion nach Allergenprovokation der Lunge. Darüber hinaus führte die Behandlung mit *Quilizumab* bei gesunden Probanden, Patienten mit allergischer Rhinitis und Patienten mit leichtem Asthma zu einer sukzessiven Reduktion des Serum-IgE-Spiegels. Diese Serum-IgE-Spiegel waren auch sechs Monate nach der letzten *Quilizumab*-Dosis anhaltend niedrig, was darauf hindeutet, dass die Behandlung mit *Quilizumab* auch zur Eliminierung von IgE-Gedächtniszellen, die zu der IgE-Produktion beisteuern, geführt hat (Gauvreau et al. 2014, Harris et al. 2016). Zusammenfassend kann man nach Analyse der Ergebnisse der präklinischen sowie klinischen Studien zu dem Schluss kommen, dass eine Therapie mit EMPD-spezifischen mAb gegenüber generell IgE-gerichteten mAb in der Therapie und Prophylaxe einiger IgE-vermittelter Krankheiten, deren klinische Symptomatik medikamentös unzureichend zu kontrollieren ist, vorteilhaft sein könnte.

1.6 CAR-T-Zelltherapie

Die Therapie mit chimären Antigenrezeptor (CAR)-T-Zellen gilt als eine der wichtigsten Erfolge in der zelluläre Immuntherapie maligner Erkrankungen der letzten Jahre. Die Ergebnisse der klinischen Studien bei Patienten mit rezidivierten oder therapierefraktären B-Zell-Malignomen führten im Jahr 2017 zur Zulassung der ersten beiden CAR-T-Zell-Arzneimittel in den USA und 2018 zur Zulassung in der EU und damit in Deutschland. Das Prinzip der adoptiven CAR-T-Zelltherapie hat ihren Ursprung in der allogenen Stammzelltransplantation, die eine der wichtigsten Behandlungsmethoden für refraktäre und rezidivierte hämatologische Malignome darstellt (Chang et al. 2016). Ausgehend von der Annahme, dass T-Zellen maßgeblich an der körpereigenen spezifischen Tumorabwehr beteiligt sind und aufgrund ihrer intrinsischen Antitumoraktivität, die beispielsweise bei einer *Graft-versus-Tumor*-Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation genutzt wird, wurden Konzepte entwickelt, um T-Zellen therapeutisch einzusetzen. Eine Strategie besteht darin, autologe T-Zellen *ex vivo* mittels retroviralem Gentransfer genetisch dahingehend zu modifizieren, dass sie einen Tumorantigen-spezifischen CAR exprimieren, der nach Infusion dieser genmodifizierten T-Zellen die spezifische Erkennung von Tumorzellen und die nachfolgende Abtötung der Tumorzellen durch die CAR-T-Zellen vermittelt. Das Konzept der *Ex-vivo*-Genmodifikation der autologen T-Zellen zur Optimierung ihrer Tumor-kontrollierenden Eigenschaften wurde erstmals vor 30 Jahren durch Eshhar *et al.* (Gross et al. 1989) dargelegt. Eine notwendige Voraussetzung für die spezifische Erkennung von Tumorzellen durch den CAR ist die Identifikation einer Zielstruktur auf der Oberfläche der Tumorzellen, die zwar auf allen Tumorzellen, nicht aber auf essentiellen Körperzellen vorkommt.

Alle zurzeit zugelassenen CAR-T-Zell-Arzneimittel folgen jedoch einem alternativen Prinzip. Sie tragen einen CAR an ihrer Zelloberfläche, der gegen das auf allen B-Zellen exprimierte Oberflächenantigen CD19 gerichtet ist. Damit werden entartete B-Zellen und normale B-Zellen eliminiert. Die damit fehlende B-Zellfunktion, die Sekretion von Antikörpern, kann jedoch substituiert werden, indem Immunglobuline gegeben werden. Gegen CD19 gerichtete CAR-T-Zellen erwiesen sich als ein bahnbrechender Erfolg in der zielgerichteten Behandlung beispielsweise der akuten lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-ALL). Hier zeigten in klinischen Prüfungen 80-90 % der an rezidivierter oder refraktärer pädiatrischer B-ALL Erkrankten eine komplette Remission, während

die Ansprechraten bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) 30-50 % betragen (2018, Maude et al. 2018, Park et al. 2018). *Tisagenlecleucel* (Kymriah) ist für die Behandlung von Kindern und jungen Erwachsenen bis zu einem Alter von 25 Jahren indiziert, die an einer refraktären oder mehrfach rezidierten akuten B-ALL erkrankt sind. Weiterhin umfasst die Indikation die Behandlung von erwachsenen Patienten mit rezidiertem oder refraktärem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) nach zwei oder mehr Linien einer systemischen Therapie. *Axicabtagene Ciloleucel* (Yescarta) ist zugelassen zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit rezidiertem oder refraktärem DLBCL sowie beim primär mediastinalem großzelligem B-Zell-Lymphom (PMBCL) nach zwei oder mehr systemischen Therapien. Im Juli 2020 wurde in den USA ein drittes CAR-T-Arzneimittel, *Brexucabtagene Autoleucel* (Tecartus), durch die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) für die Therapie des rezidierten und refraktären Mantelzelllymphoms bei Erwachsenen zugelassen. In der zulassungsrelevanten ZUMA-2-Studie sprachen zuvor 87 % der Patienten nach einmaliger Applikation der CD19-spezifischen CAR-T-Zellen an, darunter wurde bei 62 % der Patienten eine komplette Remission erzielt (Wang et al. 2020).

Neben der Verwendung von autologen T-Zellen für die CAR-T-Zelltherapie, denen *ex vivo* mittels retroviralem Gentransfer der CAR eingebracht wird, wird derzeit auch ein Ansatz verfolgt, bei dem allogene T-Zellen oder Natürliche Killer (NK)-Zellen von gesunden Spendern eingesetzt werden sollen. Allogene CAR-T-Zellen bieten potenzielle Vorteile gegenüber autologen Zellen, wie die sofortige *off-the-shelf*-Verfügbarkeit von bis zur Anwendung kryokonservierten Dosen für die Patientenbehandlung, eine mögliche Standardisierung des CAR-T-Zell-Arzneimittels, die Möglichkeit der wiederholten Infusion durch eine erhöhte Anzahl an verfügbaren allogenen T-Zellen oder die Kombination von CAR-T-Zellen, die gegen verschiedene Zielantigene gerichtet sind, und zuletzt auch die verringerten Kosten des Herstellungsverfahrens. Allogene CAR-T-Zellen können jedoch nach Infusion eine lebensbedrohliche *Graft-versus-Host*-Reaktion (GvHD) verursachen oder auch vom Immunsystem des Empfängers schneller eliminiert werden. Allogene, gegen CD19 gerichtete CAR-T-Zellen werden zurzeit in frühen klinischen Prüfungen zur Therapie einer B-ALL überbrückend bis zur anschließenden allogenen Stammzelltransplantation geprüft (NCT02808442, NCT02746952). Strategien zur Kontrolle des GvHD-Risikos

wurden mithilfe von Gen-Editierung entwickelt, indem die TCR-Expression, die die Alloreaktivität von T-Zellen vermittelt, auf den allogenen T-Zellen effizient eliminiert wird (Qasim et al. 2017).

Die Aktivierung von NK-Zellen durch Tumorzellen erfolgt im Gegensatz zu T-Zellen unabhängig von der Erkennung antigener Peptide im Kontext von *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche dieser Tumorzellen, und zeichnet sich durch eine unmittelbare Immunantwort und Zytotoxizität gegenüber entarteten Zellen aus. Weiterhin bieten allogene NK-Zellen im Gegensatz zu allogenen CAR-T-Zellen den Vorteil, dass sie nur in seltenen Fällen eine GvHD auslösen oder schwerwiegende Nebenwirkung wie das *Cytokine Release Syndrome* verursachen (Shifrin et al. 2014). Für die CAR-Gentherapie mit NK-Zellen von gesunden Spendern oder mit bestrahlten NK-Zelllinien aus etablierten Zellkulturen wurden in präklinischen Studien Hinweise auf therapeutische Effektivität und in klinischen Studien Hinweise auf Sicherheit erhalten, auch diese Zellen könnten in der zellulären Tumorthherapie eingesetzt werden (Wang et al. 2020).

1.7 Das Prinzip der chimären Antigenrezeptoren

Das Grundprinzip der CAR-T-Zell-Gentherapie zielt darauf ab, CAR-T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität gegen maligne Zellen zu richten, indem die T-Zellen mit Hilfe des CAR auf ihrer Oberfläche Antigene auf der Oberfläche maligner Zellen erkennen, an die malignen Zellen binden und diese abtöten. Um T-Zellen spezifisch gegen Antigene zu richten, werden sie gentechnisch dahingehend verändert, dass sie einen CAR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Um eine stabile Präsentation eines CAR auf der Oberfläche von T-Zellen zu erwirken, muss das für einen CAR kodierende Gen stabil in das Genom der T-Zellen integriert werden. Dazu werden retrovirale Vektoren mit der genetischen Information zur Expression des CAR versehen. Der retrovirale Vektor vermittelt den effizienten Gentransfer in die Zielzellen. Da es zur stabilen Integration in das Zellgenom kommt, bleibt die Expansion auch bei Proliferation der Zellen erhalten. Dazu können gammaretrovirale oder lentivirale Vektoren verwendet werden.

Ein CAR ist strukturell vom endogenen T-Zellrezeptor (TCR) abgeleitet und besteht im Wesentlichen aus zwei funktionellen Domänen, einer extrazellulären Antigenbindedomäne und einer intrazellulären Signaldomäne, wobei letztere zur

Aktivierung der CAR-tragende Zelle und zytotoxischen Aktivität gegenüber der antigentragenden Zielzelle führt (Abb. 3). Die extrazelluläre Antigenbindedomäne besteht klassischerweise aus einem einzelkettigen variablen Fragment (*single chain variable fragment*, scFv), das von einem mAb abgeleitet ist, und ermöglicht im Gegensatz zum endogenen TCR eine MHC Klasse I-unabhängige Antigenerkennung. Neben scFv können unter anderem Nanobodies als extrazelluläre Bindedomäne eines CAR verwendet werden. Nanobodies bestehen aus der variablen Domäne eines *Heavy-Chain*-Antikörpers aus Cameliden und sind im Gegensatz zu einem humanen Antikörper nur aus zwei schweren Ketten aufgebaut. Wegen der geringen molekularen Größe von Nanobodies vermutet man eine Bindung von Epitopen, die für konventionelle Antikörper oder scFv nicht oder nur schwer zugänglich sind (Bannas et al. 2017, Hambach et al. 2020).

Über einen flexiblen Spacer und eine Transmembrandomäne wird die extrazelluläre Domäne eines CAR mit der intrazellulären Signaldomäne verbunden, die durch die CD3 ζ -Kette eines TCR gebildet wird. Nach Bindung des CAR an ein spezifisches Antigen wird über die intrazelluläre Signaldomäne der CAR-tragenden Zelle eine Signalkaskade aktiviert, die zur Zellproliferation, Zytokinfreisetzung und schließlich zur zytotoxischen Aktivität der CAR-T-Zelle gegenüber der antigentragenden Zielzelle führt. Abhängig von der Generation des CAR enthält die intrazelluläre Signaldomäne zusätzliche kostimulatorische Domänen. Während CAR der ersten Generation keine kostimulatorischen Domänen besitzen, tragen CAR der zweiten Generation eine kostimulatorische Domäne, entweder von CD28 oder von 4-1BB. Im Vergleich zu CAR-T-Zellen der ersten Generation zeigten diese aufgrund der verstärkten Signalaktivierung eine gesteigerte Proliferation und zytotoxische Aktivität und beide waren in klinischen Studien mit hohen Ansprechraten der CAR-T-Zelltherapie bei Patienten verbunden (Sadelain et al. 2017). Die derzeit in den USA und in der EU zugelassenen CAR-T-Zell-Arzneimittel verwenden CAR der zweiten Generation mit den Signaldomänen von CD28 und CD3 ζ (Yescarta, *Axicabtagene Ciloleucel*) bzw. 4-1BB und CD3 ζ (Kymriah, *Tisagenlecleucel*). Durch Kombination von zwei kostimulatorischen Domänen, die mit der intrazellulären CD3 ζ -Kette verknüpft sind, zeigten CAR-T-Zellen der dritten Generation neben erhöhter Wirksamkeit auch eine erhöhte *In-vivo*-Persistenz. Somit wird durch einen CAR die Antigenbindungsspezifität von Antikörpern mit der intrazellulären Signaltransduktion zur Aktivierung des

zytotoxischen T-Zellprogramms in den CAR-tragenden Zellen verbunden (Jayaraman et al. 2020, Rafiq und Hackett 2020).

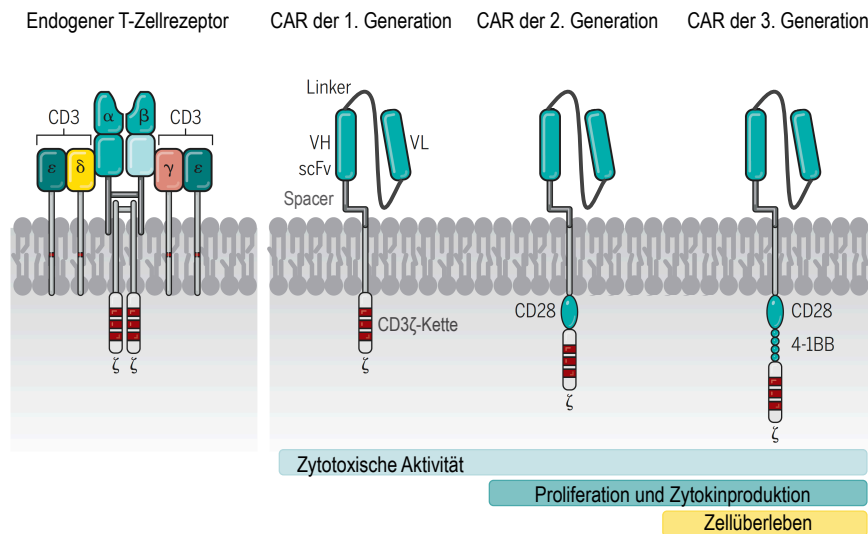


Abb. 3: Schematische Darstellung des endogenen T-Zellrezeptors und chimärer Antigenrezeptoren (CAR) der ersten, zweiten und dritten Generation. Der T-Zellrezeptor (TCR) ist aufgebaut aus einer α - und β -Untereinheit, die als Dimer die antigenspezifische Bindedomäne bilden. Über Immunglobulin-Domänen ist der α - β -Rezeptor mit der CD3 γ -, CD3 ϵ -, CD3 δ - und der CD3 ζ -Kette assoziiert, die intrazellulär aktivierende ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation*)-Motive enthalten und zusammen den CD3-Komplex bilden, über den die intrazelluläre Signaltransduktion nach Antigenbindung erfolgt. CAR bestehen in ihrer extrazellulären Bindedomäne aus einem scFv. Ein scFv ist aufgebaut aus den variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette eines Immunglobulins, die über einen Peptid-Linker verbunden sind. Das die Antigenbindung des CAR bewirkende scFv ist über einen flexiblen Spacer mit einer Transmembrandomäne und diese mit einer intrazellulären Signaldomäne verknüpft, die durch die vom TCR abgeleitete CD3 ζ -Kette gebildet wird. CAR der zweiten Generation enthalten zusätzlich zur CD3 ζ -Kette eine kostimulatorische intrazelluläre Domäne von CD28 oder 4-1BB. CAR der dritten Generation kombinieren die kostimulatorischen CD28- und 4-1BB-Domänen zur Verstärkung der Signaltransduktion (June et al. 2018, modifiziert).

2 Fragestellung

Die auf Basis des hier beschriebenen präklinischen Forschungsprojekts zu entwickelnde Therapie besonders schwerer Typ-I-Allergien beruht auf dem Prinzip der adoptiven Immuntherapie mit Hilfe von Immunzellen, die einen CAR auf ihrer Oberfläche tragen. Das Prinzip der CAR-T-Zellen soll aus der Krebstherapie übernommen werden und mit dem Ziel der Entwicklung einer Immuntherapie von Typ-I-Allergien adaptiert werden. Das adaptierte Wirkprinzip soll die nachhaltige selektive Abtötung von IgE-bildenden Zellen im Körper von Allergikerinnen und Allergikern durch spezifische CAR-T-Zellen sein (Abb. 4). Der CAR soll dabei die Erkennung membranständiger IgE-Moleküle vermitteln, sodass IgE-exprimierende Plasmazellen, Plasmablasten und B-Gedächtniszellen durch die CAR-exprimierenden Effektorzellen spezifisch abgetötet werden. Die EMPD des IgE-Moleküls kommt, wie beschrieben, nur bei membranständigem mIgE_L und nicht bei löslichem sIgE vor, ist spezifisch für IgE-produzierende Zellen und eignet sich daher als vielversprechendes Zielantigen für die Bindung eines CAR. Bei Einsatz solcher EMPD-spezifischer CAR-T-Zellen soll die Bildung neuer löslicher sIgE, die von mIgE_L-tragenden Zellen sezerniert werden, unterbunden und die Allergiesymptomatik reduziert oder sogar aufgehoben werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und ausführliche *In-vitro*-Testung EMPD-spezifischer CAR-Effektorzellen, die IgE-exprimierende Zielzellen anhand der EMPD erkennen und diese Zellen abtöten. Im Rahmen des vorliegenden Projekts sollten retrovirale Vektoren für die Expression EMPD-spezifischer CAR konstruiert werden. Anschließend sollte die Funktionalität und Spezifität der konstruierten CAR-Vektoren und der mit diesen hergestellten CAR-T-Zellen gegenüber IgE-exprimierenden Zielzellen in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays nachgewiesen werden. Mit diesem Ziel sollten die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt werden.

- i) Klonierung der gammaretroviralen Vektoren zur Expression von EMPD-spezifischen CAR, die ein von dem EMPD-spezifischen Antikörper 4b12 abgeleitetes scFv-Fragment in den Konfigurationen 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H in ihrer Bindedomäne enthalten, um Unterschiede in den Bindungseigenschaften zu testen. Herstellung entsprechender retroviraler Vektorpartikel.

- ii) Herstellung EMPD-spezifischer CAR-T-Zellen, Nachweis der stabilen Expression sowie der Lokalisation der CAR auf der T-Zelloberfläche.
- iii) Herstellung von mIgE-positiven humanen B-Zellen mit EMPD (Positivkontrolle) bzw. ohne EMPD (Negativkontrolle) als Zielzellen für *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays. Dafür sollen humane B-Zellen der Zelllinie Ramos genetisch modifiziert und als Ausgangsmaterial für die Herstellung von zwei neuen Zelllinien durch retroviralen Gentransfer genutzt werden: (1) Ramos-Zellen mit mIgE_L inklusive EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemL}) und (2) Ramos-Zellen mit mIgE_S ohne EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemS}).
- iv) Durchführung von *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays zum Nachweis von Spezifität und Funktionalität der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen. Diese sollen dazu hinsichtlich ihrer EMPD-Bindungsspezifität und Vermittlung ihrer zytotoxischen Lyseaktivität gegenüber EMPD-positiven mIgE_L-tragenden B-Zellen getestet werden.
- v) Neben humanen primären T-Zellen sollen auch Zellen der in der klinischen Erprobung befindlichen Zelllinie NK-92 als CAR-tragende Effektorzellen getestet werden.

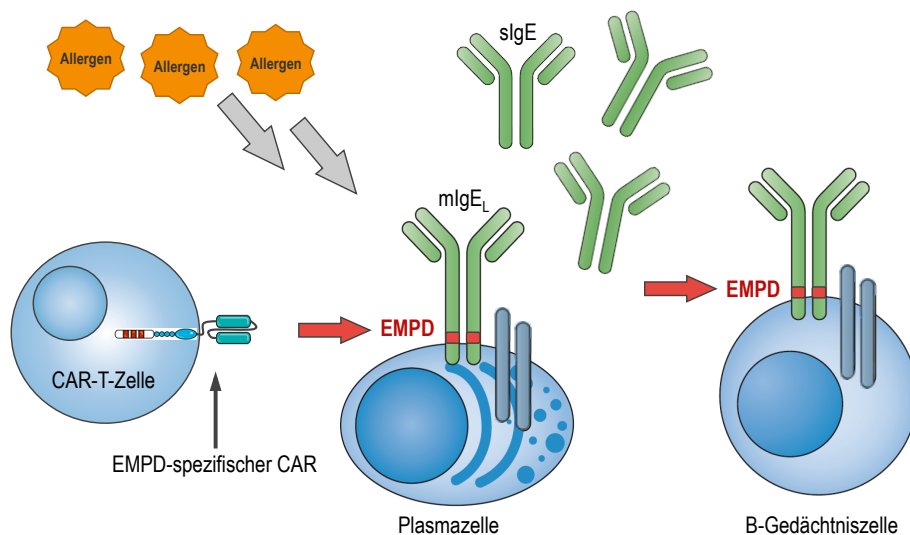


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung des hier vorgeschlagenen Therapieansatzes für die Typ-I-Allergie mittels EMPD-spezifischer CAR-T-Zellen. Die EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen erkennen membranständiges IgE (mIgE_L) auf IgE-produzierenden Zielzellen anhand der spezifischen Erkennung der EMPD des mIgE_L mit der Folge der Bindung an diese Zielzellen, Aktivierung der CAR-T-Zellen sowie Abtötung der Zielzellen durch die CAR-Effektorzellen. Damit wird die Bildung neuer löslicher IgE (sIgE), die von IgE-tragenden Zellen sezerniert werden, unterbunden und die Allergiesymptomatik wird beendet (Cambier, Gauld et al. 2007, modifiziert).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Primer

| | | |
|------|---------------|-------------------------------|
| p200 | CAR seq-fwd | CGACAAAGTTAAGTAATAGTCCCTCTCTC |
| p201 | CMV seq-fwd | CGCAAATGGGCGGTAGGC |
| p367 | IgHE seq-fwd1 | 5'-GCCAAGCAGATGTTACCTG |
| p368 | IgHE seq-rev | 5'-GTAAGATCTTCACGGTGGGC |
| p369 | IgHE seq-fwd2 | 5'-TCCACGACCAAGACCAGC |

3.1.2 Sequenzen

hu4b12 scFv-V_L-V_H (mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen NcoI/NotI und dem GGGGS-Linker):

cgat**CCATGGCC**GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGACCCCCGGCCAGCCCGCCA
GCATCAGCTGCCGAGCAGCCAGAGCATCGTGCACAGCAACGGCAACACCTACCTGGAGTGGTACCTGCA
GAAGCCCGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCAGCGGCGTGCCCGACCGC
TTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCG
TGTACTACTGCTTCCAGGGCAGCCACGTGCCCCCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCG
CGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGC
CCCCGCCTGGTGAAGCCAGCGAGACCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCTACAGCATCACCAGCG
ACTACGCTTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGCATCAGCTACAG
CGGCATCACCAGCTACAACCCAGCCTGAAGAGCCGCGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAG
TTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCATGGGCTACG
ACGGCCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC**GCGGCCGC**atcg

hu4b12 scFv-V_H-V_L (mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen NcoI/NotI und dem GGGGS-Linker):

cgat**CCATGGCC**CAGGTCCAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTCGTCAAGCCCTCCGAGACCCTCTCCC
TCACCTGCACCGTCTCGGCTACTCCATCACCTCCGACTACGCTTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGG
CAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTCCATCTCCTACTCCGGCATCACCAGGCTACAACCCCTCCCTCAAGTCC
CGCGTCACCATCTCCGTCGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTCAAGCTCTCCTCCGTCACCGCCGCCG
ACACCGCCGTCTACTACTGCGCCCGCATGGGCTACGACGGCCTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGT
CACCGTCTCCTCC**GGCGGGCGGGCTCCGGCGGGCGGGCTCCGGCGGGCGGGCTCC**GACATCGTCATG
ACCAGACCCCTCTCCCTCTCCGTCACCCCGGCCAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGCTCCTCCCAGT
CCATCGTCCACTCCAACGGCAACACCTACCTCGAGTGGTACCTCCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAGCT
CCTCATCTACAAGGTCTCCAACCGCTTCTCCGGCGTCCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACC
GACTTCACCCCTCAAGATCTCCCGCTCGAGGCCGAGGACGTCCGGCTTACTACTGCTTCCAGGGCTCCC
ACGTCCCCCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGAGATCAAGCGC**GCGGCCGC**atcg

3.1.3 Plasmide und DNA-Fragmente

| Name | Eigenschaft | Referenz |
|--|---|---|
| pcDNA3.MLV.gp | MLV Gag/Pol-Expressionsplasmid für gammaretrovirale Vektoren | (Schambach et al. 2006) |
| pMDLg/pRRE | HIV1 Gag/Pol-Expressionsplasmid für lentivirale Vektoren | (Dull et al. 1998) |
| pRSV-Rev | HIV1 Rev-Expressionsplasmid für lentivirale Vektoren | (Dull, Zufferey et al. 1998) |
| phCMV-GALV-env | GALV-Env-Expressionsplasmid | (Mock et al. 2012) |
| LeGO-iG2-Puro ⁺ -Luc2 | Lentiviraler Vektor, exprimiert Luciferase, eGFP und Puromycin-Resistenz PAC | (Weber et al. 2010) |
| LeGO-iBSD2 | Lentiviraler Vektor, exprimiert Blasticidin-Resistenz BSD | (Weber, Mock et al. 2010) |
| LeGO-iG2-BSD | Lentiviraler Vektor, exprimiert eGFP und Blasticidin-Resistenz BSD | (Weber, Mock et al. 2010) |
| pCRII-TOPO/h ϵ mL-V _{NP} | Plasmid mit cDNA der humanen Ig ϵ schweren Kette, lange Isoform | Niklas Engels, Universität Göttingen (Vanshylla et al. 2018) |
| pCRII-TOPO/h ϵ mS-V _{NP} | Plasmid mit cDNA der humanen Ig ϵ schweren Kette, kurze Isoform | Niklas Engels, Universität Göttingen (Vanshylla, Opazo et al. 2018) |
| pCSE2.5_Mu2308_HIS_myc | Plasmid mit cDNA des Nanobodys Mu2308 mit Spezifität für das <i>Clostridium difficile</i> Toxin A | Thomas Eden, AG Koch-Nolte, UKE |

| | | |
|---|--|--|
| pCSE2.5_s+16dim_rbFc | Expressionsplasmid mit <i>rabbit-Fc</i> cDNA | Thomas Eden, AG Koch-Nolte, UKE |
| pRRL.PPT.EFS.hu4b12.V _H -V _L .CAR-T.iB.pre* | Lentiviraler Vektor, exprimiert CAR mit 4b12-scFv in V _H -V _L Konfiguration und mTagBFP | Kristoffer Riecken, AG Fehse, UKE |
| pRRL.PPT.EFS.hu4b12.V _L -V _H .CAR-T.iB.pre* | Lentiviraler Vektor, exprimiert CAR mit 4b12-scFv in V _L -V _H Konfiguration und mTagBFP | Kristoffer Riecken, AG Fehse, UKE |
| pRSF91.CAR-T.Mu1067.CD28.iB.pre*-CL-Puro ⁺ | Gammaretroviraler Vektor, exprimiert CAR mit Nanobody Mu1067 und kurzem Spacer aus CD28, mTagBFP und Puromycin-Resistenz PAC | Maximilian Jung, AG Fehse, (Cichutek 2019) |
| pRSF91.CAR-T.Mu1067.h23C.iB.pre*-CL-Puro ⁺ | Gammaretroviraler Vektor, exprimiert CAR mit Nanobody Mu1067 und langem Spacer (CH2-CH3-Domänen von IgG4), mTagBFP und Puromycin-Resistenz PAC | Maximilian Jung, AG Fehse, (Cichutek 2019) |

3.1.4 Antikörper

| Antigen | Konjugat | Klon/ Bezeichnung | Verwendung/ 2 · 10 ⁵ Zellen | Hersteller |
|------------------|----------|---|---|--------------------|
| IgE | APC | MHE-18 | 1 µl | Biolegend |
| IgM | PE | MHM-88 | 1 µl | Biolegend |
| λ-Leichte Kette | AF647 | a-human lamda-Nb | 0,024 g/l | AG Koch-Nolte, UKE |
| CD38 | AF647 | BA V89 hCD38 | 4 µl | AG Koch-Nolte, UKE |
| IgG1κ | APC/PE | MOPC-21 | 2 µl | BD BioScience |
| EMPD | - | 4b12.V _H -V _L -rbFc | 5 µl | Siehe 4.1.4 |
| EMPD | - | 4b12.V _L -V _H -rbFc | 5 µl | Siehe 4.1.4 |
| <i>Rabbit-Fc</i> | PE | 711-116-152 | 0,1 µl | Dianova |
| V _H H | - | mAB77 | 1 µl | AG Koch-Nolte, UKE |

3.1.5 Zelllinien

| Name | Eigenschaften | ATCC Nr. / Referenz |
|-------------------------------------|---|--|
| HEK-293T | Humane embryonale Nierenzelllinie | CRL-11268 |
| U266 | Humane Multiple Myelom-Zelllinie | TIB196, (Nilsson et al. 1970) |
| Ramos | Humane Burkitt Lymphom-Zelllinie | CRL-1596, (Klein et al. 1975) |
| NK-92 ^{CD38^{-/-}} | NK-92-Zellen, deren CD38-Expression per CRISPR/Cas9 deletiert wurde | abgeleitet von ACC-488, (Hambach 2018) |

3.1.6 Zellkulturmedien

| | |
|--|---|
| Medium für HEK-293T-Zellen | DMEM mit 4,5 g/l Glucose und GlutaMax (Gibco) + 10 % FCS (Sigma) + 100 U/ml Penicillin (Gibco) + 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) + 25 mM HEPES (Gibco) |
| Medium für die Zelllinien Ramos und U266 | RPMI-1640 (Gibco) + 15 % FCS (Sigma) + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 25 mM HEPES |
| Medium für NK-92-Zellen | 73 ml alpha MEM + 12,5 % Pferdeserum + 12,5 % FCS (Sigma) + 2 mM Glutamin (Gibco) + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 0,1 mM 2-Mercaptoethanol (Gibco) + 200 IU/mL IL-2 (Proleukin) |
| Medium für primäre T-Zellen | 41,45 ml TexMACS + 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) + 0,05 mM β-Mercaptoethanol (Gibco) + 3,5 % humanes Serum + 20 U/ml IL-2 (Miltenyi) |

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die humanen Zelllinien in zellspezifischem Medium (siehe 3.1.6) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Suspensionszellen wurden in 25 cm²- bzw. 75 cm²-Flaschen oder 6-Well-Platten in Kultur vermehrt, während adhären wachsende Zellen in Petrischalen kultiviert wurden. Die Zelldichte betrug beim Ausplattieren zwischen 0,1-1·10⁶ Zellen/ml bei den Zielzelllinien Ramos und U266 und 1·10⁵ Zellen/ml bei NK-92-Zellen. Bei hoher Zelldichte wurden die Zellkulturen abhängig von ihrer Wachstumsrate alle zwei bis drei Tage passagiert.

3.2.2 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus einer Blutprobe

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), dazu zählen B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen, wurden durch eine Dichtegradient-Zentrifugation über eine Ficoll-Trennlösung aus Blutspendematernal aufgereinigt. Hierfür wurden sogenannte *Buffy Coats* von gesunden Spendern verwendet. Ziel der Isolation der PBMCs war es, darin enthaltene primäre T-Zellen zu expandieren, um sie mit CAR-kodierenden Vektoren zu transduzieren und hinsichtlich ihrer zielgerichteten Zytotoxizität gegenüber antigenträgenden Zielzellen in Funktionalitätsassays zu analysieren. Um zunächst die PBMCs zu isolieren, wurde der *Buffy Coat* in Schraubdeckelröhrchen überführt und in einem Verhältnis von 1:1 mit DPBS versetzt. Anschließend wurde die Blutprobe langsam auf eine Ficoll-Lösung mit der Dichte 1,077 g/ml geschichtet und bei 1000 g für 30 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten wurde die Blutprobe in Schichten aufgeteilt. Die erste Schicht besteht aus Blutplasma und wurde verworfen. Die Zellen in der darunter befindlichen Interphase sind die zu isolierenden PBMCs. Diese wurden mit einer Pipette entnommen, dreimal mit DPBS gewaschen und zuletzt in DPBS resuspendiert und auf eine Zellzahl von 5·10⁷ Zellen/ml eingestellt. Zur Lagerung wurde die Zellsuspension mit den PBMC bei 300 g für 5 min zentrifugiert, in Einfriermedium, bestehend aus humanem Serum mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), resuspendiert, aliquotiert, bei kontrollierter Abkühlungsrate im -80 °C Gefrierschrank über Nacht eingefroren und im Stickstofftank gelagert.

3.2.3 Stimulation und Expansion von primären humanen T-Zellen

Ausgehend von der in 3.2.2 erhaltenen PBMC-Zellsuspension sollten primäre humane T-Zellen isoliert und expandiert werden. Hierfür wurden die Zellen mit Anti-CD3/CD28-*Beads* (T cell TransAct, Miltenyi) für 48 h in zellspezifischem TexMACS-Medium unter Zusatz von 20 U/ml Interleukin-2 (siehe Kapitel 3.1.5) stimuliert. Rekombinante Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper sind an synthetische *Beads* gekoppelt und führen so über primäre und kostimulierende Signale zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Der CD3-Antikörper ist spezifisch gegen die ϵ -Untereinheit des T-Zellrezeptorkomplexes auf der Oberfläche dieser Zellen gerichtet. Der CD28-Antikörper ist ebenfalls gegen ein Oberflächenprotein von T-Zellen gerichtet, das kostimulatorische CD28-Rezeptormolekül. Beide Antikörper imitieren so die *In-vivo*-Stimulation von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen und führen zur Proliferation von T-Zellen *in vitro* (Smith-Garvin et al. 2009, Martkamchan et al. 2016).

3.2.4 Konstruktion der gammaretroviralen CAR-kodierenden Vektoren

Um die Bildung des EMPD-spezifischen CAR sowie des Kontroll-CAR in NK-92^{CD38/-}-Zellen und primären T-Zellen zu erreichen, wurden die cDNA-Sequenzen der spezifischen Antigenbindedomänen (siehe Tab. 2) in die in gammaretroviralen Vektoren vorliegenden CAR-Konstrukte der dritten Generation kloniert. Die Insertion in die CAR-Konstrukte erfolgte über die Restriktionsenzym-Schnittstellen NcoI und NotI. Die korrekte Insertion wurde mittels Sequenzierung überprüft. Der als Ausgangsmaterial für die weiteren Konstrukte verwendete CAR-kodierende Vektor mit kurzem Spacer mit der Bezeichnung pRSF91.Mu1076.CAR-T.CD28.iB.pre*-CL-Puro⁺ und der CAR-kodierende Vektor mit langem Spacer mit der Bezeichnung pRSF91.Mu1076.CAR-T.h23C.iB.pre*-CL-Puro⁺ waren zuvor in dieser Arbeitsgruppe konstruiert und bereits hinsichtlich ihrer Funktionalität getestet worden (Abb. 5) (Cichutek 2019, Maximilian Jung, unveröffentlicht). Die Vektoren exprimieren zusätzlich zu dem CAR-Konstrukt ein blaues Fluoreszenzprotein (mTagBFP), das die Identifizierung erfolgreich transduzierter Zellen anhand ihrer Fluoreszenz in durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen erlaubt. Eine Selektion der CAR-positiven Effektorzellen ist zudem anhand des ebenfalls im Vektor enthaltenen Resistenzgens gegen Puromycin möglich.



Abb. 5: Schematische Darstellung der CAR-exprimierenden gammaretroviralen Vektoren pRSF91.CAR-T.iB.pre*-CL-Puro⁺. Die in dieser Arbeit zu analysierenden CAR-T- und CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen wurden durch retroviralen Transfer der hier dargestellten Vektoren generiert. Der CAR besteht aus einem Signalpeptid zur Expression auf der Zelloberfläche, der antigenspezifischen Bindedomäne (austauschbar über die Restriktionsenzym-Schnittstellen NcoI und NotI), einem variablen Spacer, der Transmembranregion (TM) und den drei intrazellulären Signaldomänen CD28, 4-1BB und CD3ζ. Zudem besteht der gammaretrovirale Vektor aus 5' und 3' Long Terminal Repeats (LTR), der Leadersequenz mit Intron (Spleiß-Donor, SD und Spleiß-Akzeptor SA) und Verpackungssignal (ψ). Eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) initiiert die Translation eines blauen Fluoreszenzproteins (mTagBFP), das über ein 2A-Peptid mit der Puromycin-Resistenz (Puro^R) verknüpft ist. Vor der 3'-LTR befindet sich das Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionell regulatorische Element (wPRE*). Schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu.

3.2.5 Herstellung lentiviraler und gammaretroviraler Vektorpartikel in HEK-293T-Zellen

Die zur Herstellung lentiviraler Vektorpartikel geeignete Produktionszelllinie HEK-293T wurde mithilfe der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert (Riecken; 2007). Dazu wurden einen Tag vor Transfektion $5 \cdot 10^6$ HEK-293T-Zellen in einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Am folgenden Tag wurde vor der Transfektion neues DMEM-Medium (10 ml) mit 25 μM Chloroquin auf die Zellen gegeben. Für die Verpackung lentiviraler Vektoren erfolgt die Transfektion der Zellen mit folgenden vier Plasmiden, die einerseits das RNA-Genom der Vektorpartikel und andererseits alle zur Verpackung notwendigen viralen Proteine exprimieren: 10-20 μg des Transferplasmids (zur Transkription der RNA-Genome), 10 μg pMDLg/pRRE (kodiert für die Gag/Pol-Polyproteine), 5 μg pRSV-Rev (kodiert für das Rev-Protein) und 4 μg pHCMV-GALV-C_{4070A} (kodiert für das GALV-Hüllprotein). Zur Herstellung gammaretroviraler Vektoren wurde analog verfahren, jedoch wurden folgende Plasmide für die Transfektion verwendet: 7 μg des Transferplasmids (zur Transkription der RNA-Genome), 8 μg pHCMV.MLV.gp (kodiert für die Gag/Pol-Polyproteine) und 3 μg pHCMV-GALV-C_{4070A} (kodiert für das GALV-Hüllprotein). Nach Zugabe von 250 mM Calciumchlorid wurde dieses Plasmidgemisch in einem Gesamtvolumen von 500 μl

Wasser tropfenweise und unter ständiger Durchmischung mithilfe einer Pasteurpipette in 500 µl 2xHBS-Puffer gegeben und etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurde das DNA-Präzipitat auf die Zellen gegeben. Bei der Herstellung lentiviraler Viruspartikel wurde nach einer etwa sechsständigen Inkubation bei 37 °C das Medium abgenommen und 10 ml DMEM-Medium zugegeben. Nach 24 h konnte der Zellüberstand gewonnen werden. Bei der Herstellung retroviraler Viruspartikel wurde das Medium alle 12 h gewechselt, insgesamt wurden drei Überstände gesammelt. Der gewonnene Zellkulturüberstand enthielt die Viruspartikel und wurde mit einem 0,45 µm-Filter zellfrei filtriert und bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Gammaretrovirale Transduktion von NK-92^{CD38^{-/-}}-Effektorzellen und primären T-Zellen zur Expression der CAR-Konstrukte

Für die Transduktion von NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit gammaretroviralen Vektorpartikeln wurden 10⁵ Zellen in 500 µl zellspezifischem Medium unter Zugabe von 8 µg/ml Polybren in einer 24-Well-Platte am Vortag ausgesät. Zu den NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen wurde die Menge an Vektorüberstand hinzugegeben, die einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5 entspricht, die primären T-Zellen dagegen mit der Menge an Vektorüberstand, die einer MOI von 3 entspricht. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 1000 g und 25 °C zentrifugiert. Die Analyse der transduzierten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer LSRFortessa (BD Biosciences) drei bis vier Tage nach Transduktion. Hierbei wurde der Anteil der CAR-positiven NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen bzw. T-Zellen anhand der Expression des Fluoreszenzproteins mTagBFP quantifiziert. Die transduzierten Zellen wurden mit 2 µg/ml Puromycin im Medium selektioniert und expandiert.

3.2.7 Transduktion der Zielzelllinien mit den Reporter genen Luciferase und eGFP

Die Zielzelllinien Ramos und U266 wurden zur Expression von Luciferase und eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) mit dem Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 transduziert, um später Zytotoxizitätsassays auf Basis von Lumineszenz zu ermöglichen (Abb. 6). Dazu wurden 50 µl Virusüberstand zu 5 · 10⁵ Zellen unter Zusatz von 8 µg/ml Polybren gegeben und für 1 h bei 1000 g und 25 °C zentrifugiert. Der genannte Vektor exprimiert zusätzlich das Resistenzgen gegen Puromycin. Dadurch konnten die Zellen

3 Tage nach Transduktion unter Zusatz von 1 µg/ml Puromycin im Zellkulturmedium selektioniert werden.

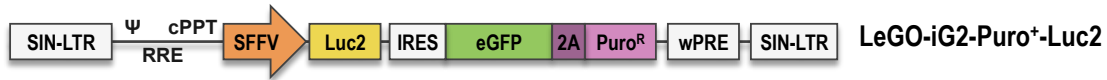


Abb. 6: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors für den Transfer der Reportergene eGFP und Luciferase (LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2) als integriertes Provirus. Die in dieser Arbeit zu analysierenden Zielzellen wurden mittels lentiviralen Transfers des hier dargestellten Vektors generiert. Der Vektor exprimiert unter Kontrolle des Spleen-Focus-Forming-Virus (SFFV)-Promoters die Firefly Luciferase Luc2. Vermittelt über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) werden von derselben mRNA das Fluoreszenzprotein eGFP und, über ein 2A-Peptid verknüpft, die Resistenz PAC zur Selektion transduzierter Zellen mittels Puromycin exprimiert. Der Vektor gehört zu den von HIV-1 abgeleiteten selbst-inaktivierenden (SIN) lentiviralen Vektoren der dritten Generation. Weiterhin sind das Verpackungssignal Ψ , das Rev-responsive Element (RRE) und der zentrale Polypurintrakt (cPPT) enthalten. Zudem ist das Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionell regulatorische Element (wPRE) enthalten. Schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu.

3.2.8 Transduktion der Ramos-Zielzellen mit der cDNA zur Expression von membranständigem IgE

Die für die schwere Kette von membranständigem IgE, mit EMPD und ohne EMPD, kodierende cDNA wurde mittels der lentiviralen Vektoren LeGO-iBSD2-hemL und LeGO-iBSD2-hemS in die Zielzelllinie Ramos eingebracht (Abb. 7). Daneben exprimieren diese Vektoren zusätzlich das Resistenzgen gegen Blasticidin (BSD). Die Blasticidinresistenz erfolgreich transduzierter Zellen dient der späteren Selektion durch Zugabe von 20 µg/ml des Antibiotikums Blasticidin ins Zellmedium. Die Ramos-Zellen wurden zuvor mit dem Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 zur Expression von Luciferase und eGFP transduziert (siehe Kapitel 4.2.7).

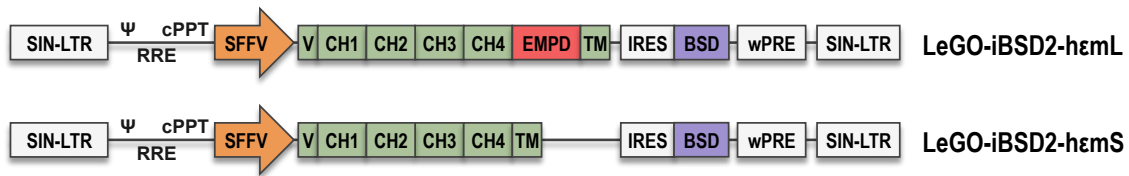


Abb. 7: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren zur Expression der schweren Kette des mIgE mit EMPD (LeGO-iBSD2-hεmL) und ohne EMPD (LeGO-iBSD2-hεmS). Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Zielzellen der Zelllinie Ramos, die zwei verschiedene Isoformen des mIgE auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden mit Hilfe der hier dargestellten lentiviralen Vektoren transduziert. Die lentiviralen Vektoren enthalten folgende Elemente: ein Verpackungssignal (Ψ), das Rev-responsive Element (RRE) und den zentralen Polypurintrakt (cPPT) aus HIV-1. Auf den SFFV-Promotor folgt die für die schwere Kette des mIgE kodierende cDNA. mIgE ist aufgebaut aus einer variablen Domäne (V), den konstanten Domänen (CH1-CH4), der nur bei der langen Isoform des mIgE vorkommenden EMPD und einer Transmembrandomäne (TM). Der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) folgt ein Blastocidinresistenzgen und das Murmeltier posttranskriptionell regulatorische Element (wPRE). Als integriertes Provirus befindet sich am 5' und 3'-Ende eine SIN-LTR.

3.2.9 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen zur Charakterisierung der Zielzelllinien

Um die Expression verschiedener Proteine auf der Oberfläche der Zielzellen im Durchflusszytometer nachzuweisen, wurden diese mithilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper gefärbt (siehe 3.1.4). Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert, mit *phosphate buffered saline* (DPBS)-Puffer mit 0,5 % BSA gewaschen und für 40 Minuten bei 4 °C mit der entsprechenden Menge des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers (siehe 3.1.3) inkubiert. Handelte es sich jedoch um einen nicht direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper, so folgte nach Inkubation mit dem sogenannten Erstantikörper und anschließendem Waschen der Zellen eine Inkubation der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, welcher gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und mit DPBS-Puffer gewaschen und am Canto II (BD Biosciences) hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen sowie mit Isotyp-Kontrollen bzw. nur mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen, anhand derer unspezifische Bindungen der Antikörper bestimmt wurden.

3.2.10 Durchflusszytometrisches Sortieren von Zellen

Um eine Zellpopulation mit spezifischen Eigenschaften aus einer heterogenen Zellprobe zu erhalten, wurde diese am Durchflusszytometer analysiert und sortiert. Eine Selektion einer spezifischen Zellpopulation ist aufgrund der Expression von Fluoreszenzproteinen oder durch Markierung mit Antikörper-Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten möglich. Die durchflusszytometrische Sortierung diente dazu, eGFP- und IgE-positive sowie EMPD-positive Zielzellen anzureichern, die mit den entsprechenden Vektoren transduziert worden waren (siehe 3.2.7 und 3.2.8). Dazu wurden die zu untersuchenden Zellproben vor der Messung mit einem IgE-spezifischen Antikörper gefärbt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) konjugiert ist bzw. mit dem EMPD-spezifischen Antikörper 4b12.V_L-V_H-rbFc und dem an Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Zweitantikörper anti-rabbit-Fc gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mithilfe des Durchflusszytometers in eGFP- und IgE-positive und eGFP-/IgE-negative Zellen bzw. EMPD-positive und EMPD-negative Zellen am Aria IIIu (BD Biosciences) sortiert. Ungefärbte Zellen sowie mit Isotyp-Kontrollen gefärbte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Die sortierten Zellen wurden anschließend in Kultur aufgenommen und vermehrt.

3.2.11 Lumineszenz-basiertes Zytotoxizitätsassay

Mithilfe von Zytotoxizitätsassays kann die spezifische Erkennung und Abtötung antigenträger Zielzellen durch CAR-Effektorzellen *in vitro* analysiert werden. Es wurden CAR-positive T- bzw. NK-92^{CD38^{-/-}}-Effektorzellen und Luciferase exprimierende Zielzellen in verschiedenen Effektor-/Zielzell (E:Z)-Verhältnissen vermischt, um einen dosisabhängigen Effekt zeigen zu können, und für 4 h in einer weißen 96-Well-Platte (OptiPlate, PerkinElmer) bei 37 °C inkubiert. Hierfür wurden die Zielzellen zuvor in Effektorzellmedium (siehe 3.1.5) auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und 100 µl vorgelegt, die Effektorzellen wurden in den den E:Z-Verhältnissen entsprechenden Mengen hinzugegeben und mit Effektorzellmedium bis zu einem Gesamtvolumen von 300 µl/Well aufgefüllt. Nach Inkubation wurden die Zellen 5 min bei 1600 rpm und 4 °C zentrifugiert, 100 µl des Überstands verworfen und je 10 µg Luciferin in 100 µl DPBS zu den Zellen gegeben. Nach exakt 20 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Lumineszenz an einem Biolumineszenzreader (VIKTOR3 Multilabel-Reader). Die Luciferase-Aktivität der

Zielzellen kann dabei als Reporter für die Vitalität der Zellen benutzt werden, da die Biolumineszenz nach Umsetzung des Substrats Luciferin durch die Luciferase ATP-abhängig ist. Als Kontrollen dienten sowohl untransduzierte CAR-negative Effektorzellen, als auch Positiv- und Negativkontroll-CAR-positive Effektorzellen. Zur Kontrolle und Bestimmung des Mittelwerts der Luciferaseaktivität der Zielzellen wurden Zielzellen ohne Effektorzellen mitgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel des hier beschriebenen Projekts ist die Herstellung von Immuneffektor-Zellen mit einer Reihe unterschiedlicher EMPD-spezifischer CAR auf ihrer Oberfläche und der Nachweis ihrer Funktionalität und Spezifität in Zellkultur. Hiermit soll die präklinische Entwicklung eines neuen Therapieansatzes für schwere Allergien etabliert werden. Mit der auf dieser Basis in der Klinik anzuwendenden Therapie sollen die IgE-produzierenden Zellen im Körper von Allergikern durch adoptive Immuntherapie selektiv eliminiert werden. Dies soll zu einem Allergie-Reset mit Reduktion der Allergiesymptomatik und klinischen Beschwerden führen, lautet die Hypothese.

Es sollten 8 verschiedene gammaretrovirale Vektoren kloniert werden, die die Expression von EMPD-spezifischen CAR vermitteln. Die Antigenbindedomäne der CAR soll hierbei entweder aus einer scFv- oder Nanobody-Domäne bestehen. Die scFv sollen in zwei unterschiedlichen Konfigurationen in die CAR eingesetzt werden, der V_H - V_L - bzw. der V_L - V_H -Konfiguration. Weiterhin sollen sich die CAR durch die unterschiedliche Länge des Spacers zwischen der scFv- bzw. der Nanobody-Domäne und der Transmembrandomäne unterscheiden, um eine verbesserte Bindung der scFv- und Nanobody-Domänen an die ggf. schwer zugängliche EMPD als Zielepitop zu ermöglichen. Des Weiteren sollen CAR-Vektoren mit scFv- bzw. Nanobody-Domänen als Positiv- bzw. Negativkontrollen kloniert werden.

Um die CAR-tragenden Effektorzellen hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktionalität testen zu können, soll zunächst ein Testsystem mit exakt definierten Zielzellen etabliert werden. Hierzu sollen lentivirale Vektoren konstruiert werden, die der Herstellung von antigentragenden Zielzelllinien dienen, die erstens membranständiges mIgE_L inklusive EMPD (Positivkontrolle) und zweitens mIgE_S ohne EMPD (Negativkontrolle) auf ihrer Oberfläche tragen. Lentivirale Vektoren zur Expression von Luciferase und eGFP liegen bereits als Ausgangsmaterial vor. Alle Vektoren sollen zur Herstellung von funktionalen Vektorpartikeln eingesetzt werden. Nach der Transduktion von Effektorzellen mit diesen Vektorpartikeln soll die Expression der CAR funktionell nachgewiesen werden.

Zudem soll neben der Funktionalität auch die Spezifität der CAR-exprimierenden Effektorzellen gegenüber den mIgE_L- und mIgE_S-tragenden Zielzellen in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays geprüft werden. Sowohl primäre T-Zellen als auch NK-92-Zellen

sollen hier als Effektorzellen erprobt werden. Weiter sollten EMPD-spezifische CAR mit einem kurzen CD28- und einem langen, IgG4-abgeleiteten Spacer vergleichend getestet werden.

4.1 Entwicklung einer idealen Testumgebung mit Zielantigen-exprimierenden Zelllinien

Für die in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays zu demonstrierende Abtötung von Zellen, die das EMPD-Zielantigen tragen, wurden humane B-Zelllinien als Zielzellen eingesetzt: U266-Zellen, die aus dem peripherem Blut eines Multiplen Myelom-Patienten isoliert worden waren und mIgE_L (inklusive EMPD) auf der Oberfläche tragen und damit als Positivkontrolle dienen sollen, sowie Ramos-Zellen, die von einem Burkitt-Lymphom-Patienten stammen. Ramos-Zellen exprimieren natürlicherweise IgM auf ihrer Oberfläche und wurden als Ausgangsmaterial für die Herstellung von zwei neuen Zelllinien mittels lentiviralem Gentransfer genutzt: 1) Ramos-Zellen mit mIgE_L inklusive EMPD und 2) Ramos-Zellen mit mIgE_S ohne EMPD. Mithilfe dieser neuen Zellen soll gezeigt werden, dass die EMPD-spezifischen CAR-Effektorzellen nur an mIgE-positive/EMPD-positive Ramos-Zellen und nicht an IgE-positive/EMPD-negative Ramos-Zellen binden und deshalb nur erstere abtöten. Die genannten Ramos-Zellen sowie Zellen der Zielzelllinie U266 sollen zudem mit dem Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 zur Expression von Luciferase und eGFP kotransduziert werden, um später Zytotoxizitätsassays auf Basis von Lumineszenz-Messungen zu ermöglichen.

4.1.1 Nachweis der stabilen Expression von eGFP- und Luciferase-Gen in LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2-transduzierten U266- und Ramos-Zellen

Die mit dem lentiviralen Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 transduzierten Zielzellen sollten neben dem Gen für die Luciferase auch das in dem Vektor vorhandene Puromycin-Resistenzgen und das Markergen eGFP exprimieren. Ein Nachweis der erfolgreichen Transduktion der Zellen wurde anhand der eGFP-Fluoreszenz der Ramos-Zellen in einer durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt. Die eGFP-Expression der transduzierten Ramos-Zellen gegenüber parentalen Ramos-Zellen wird in Abb. 8 gezeigt. Parentale untransduzierte Ramos-Zellen exprimierten wie erwartet kein eGFP, 18,5 % der transduzierte Ramos-Zellen zeigten hingegen 3 Tage nach Transduktion mit dem Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 eine eGFP-Expression. Nach Selektion mit

Puromycin für 10 Tage war eine klar abgrenzbare, zu 98,9 % eGFP-positive Zellpopulation erkennbar.

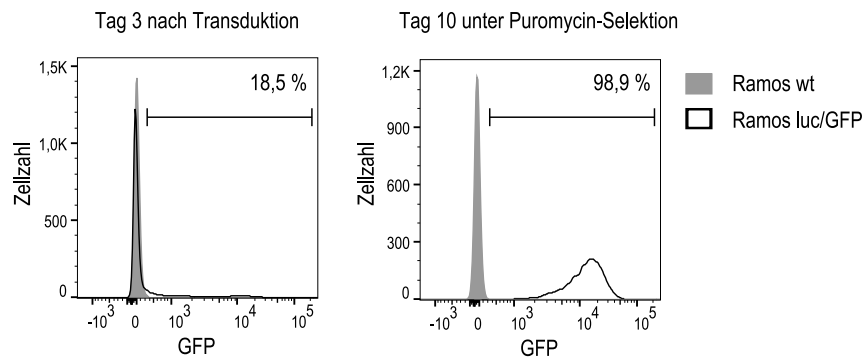


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Expression von Ramos-Zellen nach Transduktion mit dem lentiviralen Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 zur Expression von eGFP, Puromycin-Resistenz und Luciferase. Der Nachweis der erfolgten Transduktion der Ramos-Zellen wurde anhand der eGFP-Fluoreszenz in einer durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt. Die transduzierten Ramos^{luc/GFP}-Zellen sind mit schwarzer Linie dargestellt. Parentale Ramos-Zellen dienen als Negativ-Kontrolle (in grau). Links sind die Ergebnisse an Tag 3 nach Transduktion dargestellt. Der Anteil eGFP-positiver Zellen betrug 18,5 %. 3 Tage nach Transduktion wurde 1 µg/ml Puromycin zur Selektion transduzierter Puromycin-resistenter Zellen zum Zellmedium dazugegeben. Nach 10 Tagen unter Selektion wurden die Zellen erneut im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer eGFP-Expression analysiert (rechts). Der Anteil eGFP-positiver Zellen betrug nun 98,9 %.

Durch die Analyse der eGFP-Expression in Puromycin-resistenten Zellen ist ein indirekter Nachweis der Luciferase-Genexpression ableitbar, da ein dem GFP-Gen 5' vorangehendes IRES-Element die Expression der im Vektor enthaltenen GFP-cDNA, zusätzlich zu der des Puromycin-Resistenzgens und des Luciferase-Gens ermöglicht. Genauer wird von einer bicistronischen mRNA Cap-abhängig die Firefly Luciferase translatiert. Durch die darauf folgende IRES wird die Translation von eGFP initiiert, das verbunden über eine 2A-Sequenz mit der Puromycin-Resistenz einen gemeinsamen offenen Leserahmen bildet. Die 2A-Sequenz führt während der Translation dazu, dass eine Peptidbindung nicht geknüpft werden kann, woraufhin das eGFP und die Puromycin-Resistenz als getrennte Proteine freigesetzt werden. Der Nachweis von eGFP in Abb. 8 und die erfolgreiche Selektion dieser Zellen mit Puromycin lässt auch eine Expression der Luciferase erwarten.

Zellen der Zielzelllinie U266 wurden zuvor in dieser Arbeitsgruppe mit dem Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 transduziert und lagen bereits als U266^{luc/GFP}-Zellen vor. Die eGFP-Expression wurde auch hier als Nachweis der erfolgreichen Transduktion mit dem für eGFP und Luciferase kodierenden Vektor betrachtet. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Fluoreszenzintensitäten von U266^{luc/GFP}-Zellen im eGFP-Kanal. Im Vergleich zu parental U266-Wildtyp-Zellen zeigten sich U266^{luc/GFP}-Zellen als eine gut abgrenzbare eGFP-positive Zellpopulation.

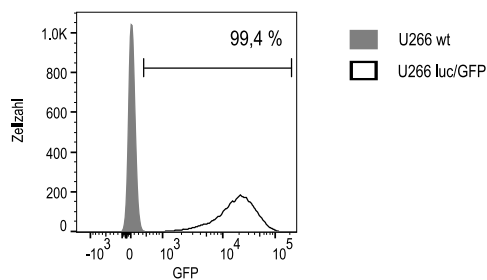


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Expression von parental U266-Wildtyp-Zellen und U266-Zellen nach Transduktion mit dem lentiviralen Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 zur Expression von eGFP, Puromycin-Resistenz und Luciferase. Parentale U266 wt- und U266^{luc/GFP}-Zellen wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer eGFP-Expression analysiert, um eine erfolgreiche Transduktion mit dem für eGFP und Luciferase kodierenden Vektor LeGO-iG2-Puro⁺-Luc2 nachzuweisen. Parentale U266 wt-Zellen (grau) zeigten keine eGFP-Expression (0,1 %), während der Anteil eGFP-positiver Zellen der transduzierten U266^{luc/GFP}-Zellen (schwarze Linie) 99,4 % betrug.

4.1.2 Stabile Oberflächenexpression der schweren Kette von membranständigem IgE auf Ramos-Zellen

Zellen der Zelllinie Ramos wurden genetisch modifiziert, so dass sie mIgE stabil auf ihrer Zelloberfläche tragen. Dazu wurden zwei lentivirale Vektoren für die Übertragung der cDNA kloniert, die die schwere Kette der *long form* des mIgE_L (mit EMPD) (*human Ig epsilon heavy chain cDNA, long isoform* (hemL)) bzw. die *short form* des mIgEs (ohne EMPD) (*human Ig epsilon heavy chain cDNA, short isoform* (hemS)) kodieren. Für die Vektorkonstruktion wurde die cDNA von IgE (mit EMPD) bzw. die cDNA der verkürzten Form des IgE (ohne EMPD), abgeleitet aus U266-Zellen und zur Verfügung gestellt von Dr. Niklas Engels, Universität Göttingen (Vanshylla, Opazo et al. 2018), in den Blasticidin-Resistenzgen tragenden lentiviralen Vektor LeGO-iBSD2 inseriert. Dadurch entstanden die Vektoren LeGO-iBSD2-hemL und LeGO-iBSD2-hemS (siehe Abb. 7). Die so generierten Plasmide wurden dann in zwei separaten Transfektionen der

Verpackungszellen HEK-293T zur Herstellung der entsprechenden Viruspartikel genutzt. Diese werden von den mit einem Plasmid transfizierten Verpackungszellen in den Zellüberstand abgegeben. Die virushaltigen Zellüberstände wurden zur Transduktion von Ramos^{luc/GFP}-Zellen eingesetzt. Mittels Blasticidin-Selektion und Expansion entstand so eine IgE-positive Population von LeGO-iBSD2-hemL-positiven/EMPD-positiven Ramos-Zellen (Ramos^{luc/GFP-hemL}) bzw. LeGO-iBSD2-hemS-positiven/EMPD-negativen Ramos-Zellen (Ramos^{luc/GFP-hemS}). Bereits die erfolgreiche Expansion der jeweils separat transduzierten Zellpopulation unter Zugabe von Blasticidin zum Zellmedium wies auf eine erfolgreiche Transduktion mit den Viruspartikeln hin, die die schwere Kette des IgE (hemL bzw. hemS) und zugleich das Blasticidin-Resistenzgen kodieren. Zusätzlich zum Nachweis der erfolgreichen Transduktion soll auch die Expression des vollständigen IgE-Moleküls, bestehend aus der schwere Kette des IgE, hemL bzw. hemS, und der leichten Kette λ , die von den Ramos-Zellen selbst gebildet wird, an der Oberfläche der transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Ramos-Zellen exprimieren natürlicherweise IgM, inklusive der λ -leichten Kette, auf ihrer Oberfläche, sodass die Bildung eines funktionalen IgE-Moleküls durch Kombination mit der λ -leichten Kette möglich ist.

Der Nachweis der IgE-Oberflächenexpression auf den transduzierten Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen wurde mithilfe durchflusszytometrischer Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein IgE-spezifischer Antikörper verwendet, der direkt an das fluoreszierende Molekül APC gekoppelt ist. Über die Bindung des Antikörpers an membranständiges IgE auf der Zelloberfläche wurde so die IgE-Expression gemessen. Des Weiteren wurden die GFP-positiven/IgE-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert und in Kultur aufgenommen. In Abb. 10 ist die Analyse der neu generierten Zellen inklusive Positiv- und Negativ-Kontrollen dargestellt.

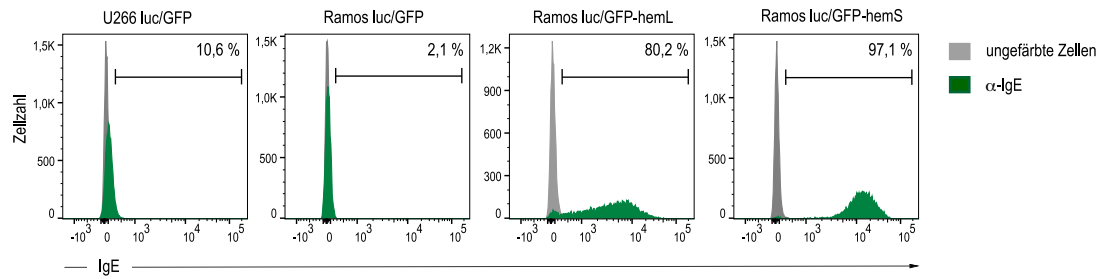


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analyse der IgE-Oberflächenexpression auf U266- und Ramos-Zielzellen. U266^{luc/GFP}-Zellen zeigen eine schwache IgE-Oberflächenexpression, nur etwa 10 % der Zellen wurden eindeutig angefärbt, während Ramos^{luc/GFP}-Zellen erwartungsgemäß IgE-negativ sind. Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen sind mit einem Anteil von 80,2 % bzw. 97,1 % als IgE-positive Population dargestellt (grüne Fläche). Als Kontrolle dienten jeweils ungefärbte Zellen, deren Eigenfluoreszenz in grauer Farbe dargestellt ist.

Der Nachweis der IgE-Expression auf der Zelloberfläche erfolgte durch durchflusszytometrische Analyse von Fluoreszenzintensitäten. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten im APC-Kanal zeigt nach rechts verschobene Signalpeaks als Indikatoren der IgE-Oberflächenexpression bei den mit den für IgE kodierenden Vektoren transduzierten Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen gegenüber Ramos^{luc/GFP}-Zellen (Abb. 10). Es zeigte sich ein Anteil von 80,2 % bzw. 97,1 % IgE-positiven Zellen. Die IgE-Expressionsstärke der Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen zeigt sich im Vergleich zu Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit einem Unterschied von einer Zehnerpotenz höher. Es ist damit von einer in etwa 10-fach höheren IgE-Expression auf Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen auszugehen. Diese Beobachtung begründet sich in der regulatorischen Funktion der EMPD. Die EMPD fungiert als ein Retentionssignal im endoplasmatischen Retikulum und führt in mIgE_L-tragenden B-Zellen zu einer eingeschränkten IgE-Oberflächenexpression (Vanshylla, Opazo et al. 2018). Ramos^{luc/GFP}-Zellen wiesen keine IgE-Expression auf der Oberfläche auf. U266^{luc/GFP}-Zellen exprimieren natürlicherweise IgE auf ihrer Zelloberfläche und dienten als Positiv-Kontrolle. Die IgE-Expression der U266-Zellen zeigte sich so schwach, dass nur 10,6 % der Zellen eindeutig angefärbt werden konnten. Die Ergebnisse bestätigten somit die erfolgreiche Herstellung der gewünschten IgE-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zelllinien.

4.1.3 Charakterisierung der Zielzellen

Zur weiteren Charakterisierung der generierten Zielzelllinien wurden diese in durchflusszytometrischen Analysen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression von IgM, der λ -Leichten Kette und CD38 untersucht. Zellen der Zelllinie Ramos sind monoklonale B-Lymphozyten, die u.a. durch ihre IgM-Oberflächenexpression gekennzeichnet sind (Klein, Giovanella et al. 1975). Erst wenn sowohl die schwere als auch die leichte Kette des Immunglobulins von der Zelle synthetisiert wurde, werden diese gepaart und als intakter IgM-B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche exprimiert. Der Nachweis der Expression der leichten Kette lässt demnach auf die Expression der schweren Kette eines Immunglobulins schließen (Wang 2020). Neben der IgM-Expression wurde zur Charakterisierung auch die Expression der λ -Leichten Kette auf den Ramos-Zellen analysiert. Die Expression von CD38 auf der Oberfläche der Zielzellen wurde bestimmt, da dieses ein bekanntes B-Zell-Antigen ist und dementsprechend von U266- und Ramos-Zellen exprimiert werden sollte (Funaro et al. 1990). In nachfolgenden Zytotoxizitätsassays sollten Effektorzellen gegen ein auf allen Zielzellen vorhandenes Antigen gerichtet werden, sodass diese als Positivkontrolle dienen können. Die Oberflächenexpression wurde durch Antikörperfärbungen evaluiert. Dazu wurden Zellproben aller Zielzelllinien mit entsprechenden antigenspezifischen Antikörpern inkubiert (siehe 3.1.3 und 3.2.9). Die Ergebnisse bestätigen die Oberflächenexpression der λ -Leichten Kette und CD38 auf Zellen aller vier Zelllinien, wobei die Expressionslevel in den einzelnen Zelllinien teilweise deutlich variierten. Die Unterschiede der Expressionsniveaus der untersuchten Zelllinien sind in Abb. 11 dargestellt. Die Expression der λ -Leichten Kette betrug bei Ramos^{luc/GFP}-Zellen 42 %, alle anderen zeigten Expressionslevel von mehr als 60 %. Zellen aller Ramos-Zelllinien zeigten eine sehr hohe CD38-Expression, U266-Zellen wiesen dagegen teilweise eine geringe Oberflächenexpression des CD38 auf. Die Oberflächenexpression von IgM dagegen kann nicht sicher auf allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden.

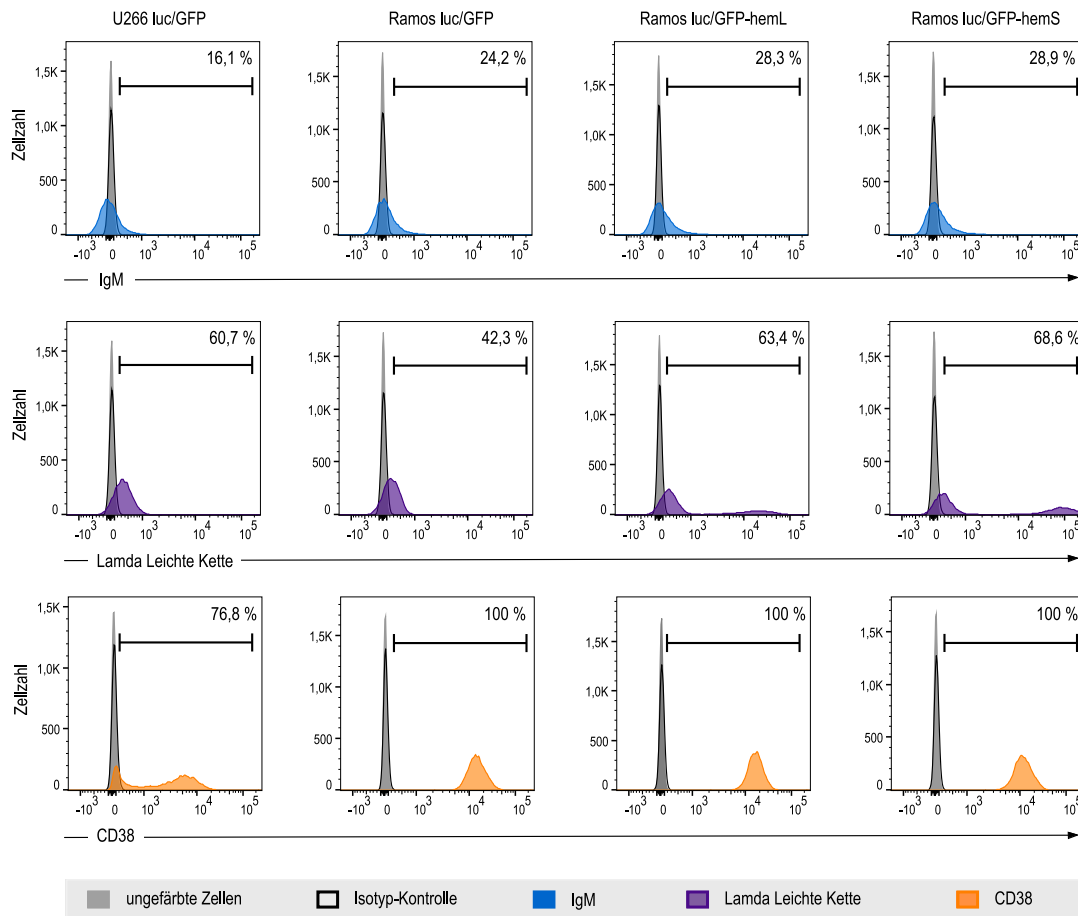


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von IgM, der λ -Leichten Kette und CD38 auf Ramos- und U266-Zielzellen. Eine eindeutige Oberflächenexpression von IgM (blau) konnte auf den untersuchten Zielzelllinien nicht sicher nachgewiesen werden. Die Expression der λ -Leichten Kette (violett) und CD38 (orange) dagegen konnte auf der Zelloberfläche aller untersuchten Zelllinien gezeigt werden. Die Analyse der Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen zeigt zwei unterschiedlich stark die λ -Leichten Kette exprimierende Populationen. Ramos-Zellen zeigten eine CD38-Expression von 100 %, U266^{luc/GFP}-Zellen von 76,8 % (orange). Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (graue Fläche), sowie mit einer Isotypkontrolle gefärbte Zellen (schwarze Linie).

4.1.4 Konstruktion eines EMPD-spezifischen Antikörpers und Nachweis der EMPD-Oberflächenexpression auf Zielzellen

Um ein ideales Testsystem mit definierten Zielzellen aufzubauen, mit und ohne Expression des gewünschten Antigens auf der Zieloberfläche, musste zunächst eine Methode zum Nachweis und zur Differenzierung dieser antigentragenden Zellen etabliert werden. Dazu wurde ein rekombinanter Antikörper konstruiert, der spezifisch

an die EMPD des membranständigen IgE bindet. Abb. 12 zeigt den schematischen Aufbau des in der vorliegenden Arbeit hergestellten EMPD-spezifischen Antikörpers.

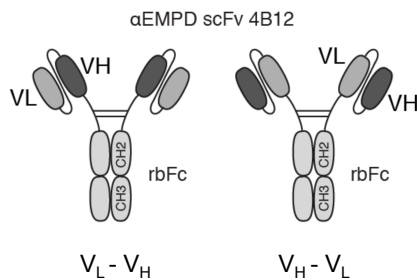


Abb. 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der EMPD-spezifischen Antikörper 4b12.V_H-V_L-rbFc und 4b12.V_L-V_H-rbFc. Die hier konstruierten EMPD-spezifischen Antikörper sind Fusionsproteine bestehend aus einem scFv-Fragment, welches die antigenbindende Domäne darstellt, und der Fc-Region eines IgG von Kaninchen. Das scFv ist aufgebaut aus der variablen Region der schweren Kette (V_H), die über einen Peptid-Linker an die variable Region der leichten Kette (V_L) des ursprünglichen, EMPD-spezifischen Antikörpers 4b12 gekoppelt ist. Abgebildet sind die zwei unterschiedlichen Konfigurationen des scFv, die an die rbFc-Region fusioniert wurden: die V_H-V_L- (links) und die V_L-V_H-Konfiguration (rechts). Das Fc-Fragment wird gebildet aus den konstanten Regionen der schweren Kette C_{H2} und C_{H3} (modifiziert nach Eden et al. 2017).

Um einen EMPD-spezifischen Antikörper zu konstruieren, wurde ein scFv-Fragment von Antikörpern an die *Fragment Crystallisable* (Fc)-Region eines IgG von Kaninchen (rbFc, *rabbit*-Fc) fusioniert. So entstand ein scFv-Fc-Fusionsprotein. Das scFv-Fragment wurde von dem EMPD-spezifischen Antikörper 4b12 abgeleitet und besteht aus den variablen Regionen der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H), die über einen Peptid-Linker kovalent miteinander verknüpft sind, und enthält die spezifische Antigenbindedomäne des 4b12-Antikörpers (Chen, Wu et al. 2010). Das scFv wurde in zwei unterschiedlichen Konfigurationen, der V_H-V_L- bzw. der V_L-V_H-Konfiguration, an die rbFc-Region fusioniert. Diese ist aufgebaut aus einem Dimer der schweren Ketten C_{H2} und C_{H3}. Um die gewünschten scFv-rbFc-Fusionsproteine herzustellen, wurden HEK-293T-Zellen mit den Vektoren pCSE2.5_hu4b12.V_H-V_L_rbFc und pCSE2.5_hu4b12.V_L-V_H_rbFc transfiziert und konnten anschließend aus dem Zellüberstand gewonnen werden. Die Produktion und Aufreinigung der EMPD-spezifischen Fusionsproteine erfolgte durch Thomas Eden und Natalie Tode aus der Arbeitsgruppe Koch-Nolte, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die Analysen der aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK-293T-Zellen gewonnenen und aufgereinigten Fusionsproteine 4b12.V_H-V_L-rbFc und 4b12.V_L-V_H-rbFc ergaben detektierbare Banden auf einem *sodium dodecyl sulfat* (SDS)-Gel. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

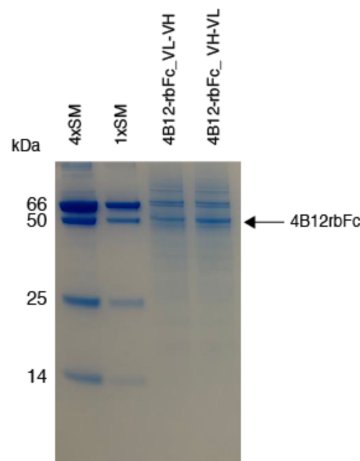


Abb. 13: Analyse der aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK-293T-Zellen gewonnenen Antikörper-Fusionsproteine 4b12.V_H-V_L-rbFc und 4b12.V_L-V_H-rbFc mittels SDS-PAGE. Zur Analyse wurden 10 µl Kulturüberstand von HEK-293T-Zellen, die mit den Expressionsvektoren pCSE2.5_hu4b12.V_H-V_L_rbFc und pCSE2.5_hu4b12.V_L-V_H_rbFc transfiziert wurden, auf einem SDS-Gel aufgetragen. Auf der linken Seite des SDS-Gels wurde ein Proteinmarker aufgetragen, der die Molekülmasse der den Banden auf der Membran entsprechenden Proteine in kDa angibt. Der für das scFv-rbFc-Fusionsprotein berechnete Wert der Molekülmasse beträgt 50 kDa. Eine entsprechende Bande beider Fusionsproteine konnte detektiert werden (durchgeführt durch Natalie Tode, AG Koch-Nolte, UKE).

Die EMPD-spezifischen 4b12.V_H-V_L-rbFc- und 4b12.V_L-V_H-rbFc-Antikörper-Fusionsproteine wurden darauffolgend zur Charakterisierung der Zielzellen bezüglich ihrer Oberflächenexpression von membranständigem IgE inklusive EMPD eingesetzt. In durchflusszytometrischen Analysen wurden dazu die Fusionsproteine in Färbungen von Zielzellproben als Erstantikörper verwendet. Die Zielzellen wurden wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben behandelt und mit dem EMPD-spezifischen Erstantikörper inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein PE-konjugierter Anti-*rabbit*-Antikörper verwendet, der spezifisch an die *rabbit*-Fc-Region des jeweilig eingesetzten Erstantikörpers bindet. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse der Analyse der EMPD-Oberflächenexpression auf U266^{luc/GFP}-, Ramos^{luc/GFP}-, Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zielzellen.

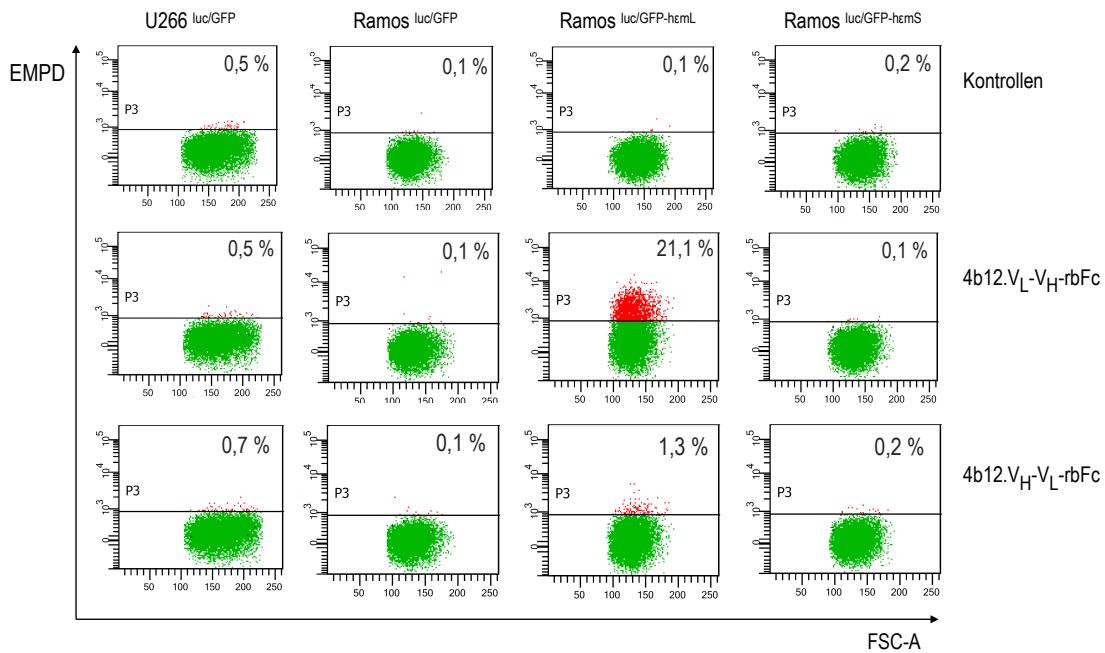


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der EMPD-Oberflächenexpression auf Ramos- und U266-Zielzellen mithilfe des EMPD-spezifischen Antikörpers 4b12.V_H-V_L-rbFc und 4b12.V_H-V_L-rbFc. Dargestellt sind in der ersten Zeile Kontroll-Anfärbungen für unspezifische Bindungen mit dem Zweitantikörper allein, in der zweiten Zeile Anfärbungen mit dem Antikörper 4b12.V_L-V_H-rbFc und in der dritten Zeile Anfärbungen mit dem Antikörper 4b12.V_H-V_L-rbFc. In der dritten bzw. vierten Spalte sind die Anfärbungen der EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}- bzw. der EMPD-negativen Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen dargestellt. U266^{luc/GFP}- (erste Spalte) und Ramos^{luc/GFP}-Zellen (erste Spalte) stellen sich in der Analyse als EMPD-negative Zellen dar. In rot dargestellt ist die EMPD-positive Zellfraktion der Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, da der Antikörper 4b12.V_H-V_L-rbFc (mittlere Zeile) und der Antikörper 4b12.V_L-V_H-rbFc (untere Zeile) spezifisch an die EMPD binden. Die Bindung des Antikörpers 4b12.V_L-V_H-rbFc an die EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen erfolgt dabei stärker (21,1 % positive Zellen) als die Bindung des Antikörpers 4b12.V_H-V_L-rbFc an diese Zellen (1,3 % positive Zellen). Bei beiden Zellen ist anzunehmen, dass sie aufgrund des exprimierten IgE EMPD-positiv sind.

Durch die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse sollte zum einen der Nachweis der EMPD-Oberflächenexpression mithilfe von Antikörperbindung und durchflusszytometrischer Analyse erbracht werden. Zum anderen sollten die Funktionalität und Bindungsspezifität der hier konstruierten EMPD-spezifischen scFv-rbFc-Antikörper-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, die an ihrer Oberfläche membranständiges IgE inklusive EMPD tragen, zeigten eine spezifische Bindung durch beide EMPD-gerichteten Antikörper, wenngleich zu unterschiedlichen Anteilen von 21 % mit 4b12.V_L-V_H-rbFc bzw. 1,3 % mit 4b12.V_H-V_L-rbFc. Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen, die membranständiges IgE ohne EMPD

exprimieren, zeigten dagegen wie erwartet keine EMPD-spezifische Bindung. U266^{luc/GFP}- und Ramos^{luc/GFP}-Zellen wurden ebenfalls nicht durch die EMPD-spezifischen Antikörper angefärbt. Zu erkennen ist weiterhin eine stärkere Anfärbung der EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen durch den Antikörper 4b12.V_L-V_H-rbFc als durch 4b12.V_H-V_L-rbFc, die sich in der Konfiguration des scFv-Fragments unterscheiden. Dies ist als geringere Affinität des Antikörper-Fusionsproteins 4b12.V_H-V_L-rbFc zu erklären. Neben dem Nachweis der spezifischen Erkennung der EMPD durch die EMPD-spezifischen Fusionsproteine führte das Experiment weiterhin also zu dem gewünschten Ergebnis, nämlich dem Nachweis der gelungenen Herstellung der Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zelllinien, die das Zielantigen mit dem Epitop in der EMPD tragen bzw. denen dieses Zielantigen und Zielepitop fehlt. In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit hergestellten Zielzelllinien sowie ihre Eigenschaften zusammenfassend dargestellt. Die Oberflächenexpression verschiedener Proteine auf den untersuchten Zellen wurde in den vorherigen Abschnitten in durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen. Die Ergebnisse galten als notwendige Voraussetzung für die im Verlauf durchzuführenden Zytotoxizitätsassays.

| Zielzelllinien | Eigenschaften |
|-------------------------------|---|
| Ramos ^{luc/GFP-hemL} | Luc+ / GFP+ / CD38+ / λ-Leichte Kette / IgM / IgE (+EMPD) |
| Ramos ^{luc/GFP-hemS} | Luc+ / GFP+ / CD38+ / λ-Leichte Kette / IgM / IgE (-EMPD) |
| Ramos ^{luc/GFP} | Luc+ / GFP+ / CD38+ / λ-Leichte Kette / IgM |
| U266 ^{luc/GFP} | Luc+ / GFP+ / CD38+ / λ-Leichte Kette / IgE (+EMPD) |

Tab. 1: Tabellarische Übersicht der genetisch modifizierten Zielzellen. Alle Zielzelllinien wurden mit den Reportergenen für Luciferase und GFP ausgestattet. Ramos-Zellen exprimieren natürlicherweise CD38, λ-Leichte Kette und IgM. Zusätzlich wurden Ramos-Zellen mit Vektoren kodierend für membranständiges IgE, einmal mit und einmal ohne EMPD transduziert. Zellen der Zelllinie U266 exprimieren natürlicherweise CD38, die λ-Leichte Kette und membranständiges IgE.

4.2 Genetische Modifikation von primären T-Zellen und NK-92-Zellen zur Expression der CAR

4.2.1 Herstellung gammaretroviraler Vektoren mit EMPD-spezifischen CAR

In eigenen Vorarbeiten wurde bereits der gammaretrovirale Vektor pRSF91.CAR-T.iB.pre*-CL-Puro⁺ zur Expression modularer CAR entwickelt, dargestellt in Abb. 5 (Cichutek 2019). Der modulare CAR ist geeignet für die Verwendung eines scFv oder eines Nanobodies als Bindedomäne, von diesen ausgehend können Varianten mit verschieden langen Spacern zwischen Bindedomäne und Transmembrandomäne konstruiert werden. Zudem umfassen die Vektoren austauschbare intrazelluläre Signaldomänen für die Signaltransduktion in T-Zellen bzw. in NK-Zellen. Diese werden gebildet durch eine CD28-, eine 4-1BB-Domäne und die CD3 ζ -Kette. Verschiedene CAR-Konstrukte, die sich in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden, sollten vergleichend in Bezug auf ihre Zytotoxizität gegenüber Zielzellen getestet werden. Daher wurden EMPD-spezifische CAR konstruiert, die einen langen oder einen kurzen Spacer kodieren. Der lange Spacer wurde von der Hinge-Region der konstanten Domäne eines Immunglobulins der Klasse G4 (IgG4) abgeleitet und enthält neben der Hinge-Region ebenfalls die C_{H2}- und C_{H3}-Domäne (Hinge-C_{H2}-C_{H3}, abgekürzt h23C). Der kurze Spacer dagegen ist abgeleitet von der Hinge-Region des Oberflächenproteins CD28 von naiven T-Zellen (abgekürzt CD28) (Abb. 15) (Cichutek 2019).

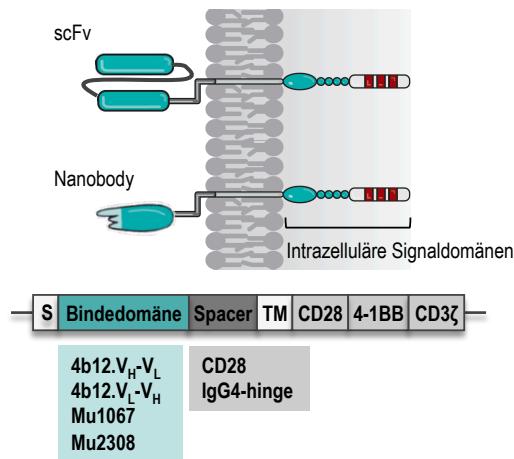


Abb. 15: Schematische Darstellung der für die verschiedenen EMPD-spezifischen CAR und Kontroll-CAR kodierenden Regionen des gammaretroviralen Vektors für die Expression in T- und NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen. Die in dieser Arbeit zu analysierenden CAR-T- bzw. CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen sollten die hier dargestellten CAR an ihrer Oberfläche tragen und wurden daher mit Hilfe der hier dargestellten Vektoren generiert. Die extrazelluläre Region des CAR besteht aus einer antigenspezifischen Bindedomäne sowie einem Spacer. Die Bindedomäne wird entweder durch die EMPD-spezifischen scFv-Fragmente 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H gebildet oder wird bei der Positiv- und Negativ-Kontrolle durch die Nanobodies Mu1067 und Mu2308 gebildet. Die Transmembrandomäne (TM) wird über einen kurzen CD28- oder einen langen IgG4-abgeleiteten Spacer mit der Antigenbindedomäne verknüpft. Auf die Transmembrandomäne folgen die intrazellulären Signaldomänen von CD28 und von 4-1BB sowie die CD3ζ-Kette.

Um CAR-Konstrukte herzustellen, die ein spezifisch gegen die EMPD gerichtetes scFv enthalten, wurde die cDNA eines scFv von dem EMPD-spezifischen, humanisierten Antikörper 4b12 abgeleitet (Chen, Wu et al. 2010). Zwei kodon-optimierte cDNA dieses 4b12-scFv wurden sodann über eine gerichtete Klonierung in zwei verschiedenen Konfigurationen, V_H-V_L bzw. V_L-V_H, in das CAR-Konstrukt inseriert (Abb. 16).

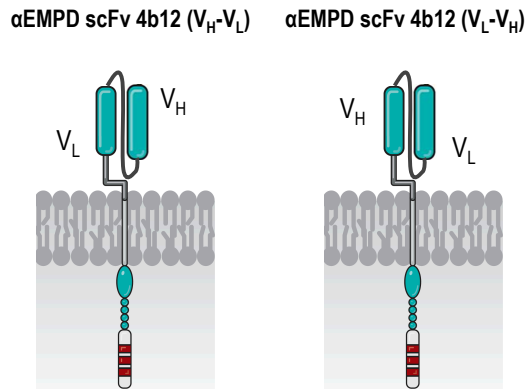


Abb. 16: Schematische Darstellung der EMPD-spezifischen scFv-basierenden CAR der dritten Generation. Die beiden CAR bestehen aus einem scFv als extrazelluläre Bindedomäne, aufgebaut aus den variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette eines Immunglobulins, die über einen Peptid-Linker (3xGly-Gly-Gly-Gly-Ser) verbunden sind. Das als Antigen-Bindedomäne fungierende scFv ist über eine C-terminale flexible Hinge-Region, auch Spacer, an eine Transmembrandomäne und an intrazelluläre Signaldomänen gekoppelt, gebildet aus einer CD3 ζ -Kette und den kostimulatorischen CD28- und 4-1BB-Domänen.

Als Positiv- und Negativkontrolle wurden zudem Bindedomänen, bestehend aus dem Nanobody Mu2308, einem *Clostridium difficile* Toxin A-spezifischen Nanobody, als auch dem Nanobody Mu1067, der gegen CD38 gerichtet ist, jeweils anstelle der EMPD-spezifischen scFv-cDNA in die für die CAR kodierende Region inseriert. Die CAR-T^{Mu2308}-Zellen dienten als Negativ-Kontrollen, denn die Nanobody-basierte Bindedomäne des von diesen Zellen exprimierten CAR^{Mu2308} ist gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet, das nicht von den Zielzellen exprimiert wird. Die CAR-T^{Mu1067}-Zellen enthielten einen CAR mit dem gegen das Oberflächenprotein CD38 gerichteten Nanobody Mu1067 in ihrer Bindedomäne. CD38 kommt auf B-Zellen, Plasmazellen, T- und NK-Zellen und myeloischen Vorläuferzellen vor und wurde auf allen Zielzellen nachgewiesen. CAR-T^{Mu1067}-Zellen dienten daher als Positiv-Kontrolle in Zytotoxizitätsassays. Damit entstand eine Bibliothek von CAR-Vektoren ausgehend von dem Vektor pRSF91.CAR-T.iB.pre*-CL-Puro⁺, die jeweils eine cDNA der 8 unterschiedlichen CAR in den verschiedenen Konfigurationen tragen (Tab. 2).

| Bezeichnung des CAR | Spezifität der Bindedomäne | Spacer |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|
| CAR ^{Mu1067.CD28} | CD38 (Positiv-Kontrolle) | CD28, kurz |
| CAR ^{Mu2308.CD28} | Toxin A (Negativ-Kontrolle) | CD28, kurz |
| CAR ^{4b12.VH-VL.CD28} | EMPD | CD28, kurz |
| CAR ^{4b12.VL-VH.CD28} | EMPD | CD28, kurz |
| CAR ^{Mu1067.h23C} | CD38 (Positiv-Kontrolle) | h23C, lang |
| CAR ^{Mu2308.h23C} | Toxin A (Negativ-Kontrolle) | h23C, lang |
| CAR ^{4b12.VH-VL.h23C} | EMPD | h23C, lang |
| CAR ^{4b12.VL-VH.h23C} | EMPD | h23C, lang |

Tab. 2: Tabellarische Übersicht der neu entwickelten CAR, der Spezifität ihrer Bindedomäne und der Variante des Spacers. Alle 8 CAR wurden im gammaretroviralen Vektoren pRSF91.CAR-T.iB.pre+-CL-Puro+ kloniert und erfolgreich zur Herstellung von funktionalen Vektorpartikeln eingesetzt. Diese wurden zur Transduktion von primären humanen T-Zellen und NK-92^{CD38-/-}-Zellen verwendet.

Um die Klonierungen der verschiedenen CAR-kodierenden gammaretroviralen Vektoren zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierung aller Vektoren durchgeführt. Die korrekte Klonierung und gewünschte Nukleotidsequenz der cDNA wurde nachgewiesen. Alle Vektoren wurden anschließend erfolgreich zur Herstellung von funktionalen Vektorpartikeln eingesetzt.

4.2.2 Stabile retrovirale Transduktion von primären T-Zellen mit CAR-kodierenden Vektoren und Nachweis der Expression der CAR-Konstrukte

Primäre humane T-Zellen wurden mit den für die unterschiedlichen CAR kodierenden gammaretroviralen Vektoren (Abb. 5 und Abb. 15) transduziert, um nachzuweisen, dass die verschiedenen CAR stabil auf der Zelloberfläche exprimiert werden und eine EMPD-spezifische Bindung und zytotoxische Aktivität gegenüber antigenträgenden Zielzellen vermitteln. Dazu wurden primäre T-Zellen ausgehend von einer PBMC-Zellsuspension durch Stimulation mit Anti-CD3/CD28-*Beads* gewonnen und unter Zugabe von IL-2 expandiert (3.2.3). Nach 48-stündiger Stimulation wurden die

primären T-Zellen separat mit je einem der 8 verschiedenen CAR-kodierenden Vektoren aus Tab. 2 transduziert. Diese vermitteln die Expression der CAR, die als Bindedomäne die EMPD-spezifischen scFv 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H oder den Nanobody Mu1067 (Positivkontrolle) bzw. den Nanobody Mu2308 (Negativkontrolle) enthalten. Anschließend wurden die mit den CAR-Vektoren transduzierten T-Zellen anhand eines in den CAR-Vektoren enthaltenen Puromycin-Resistenzgens selektioniert und expandiert.

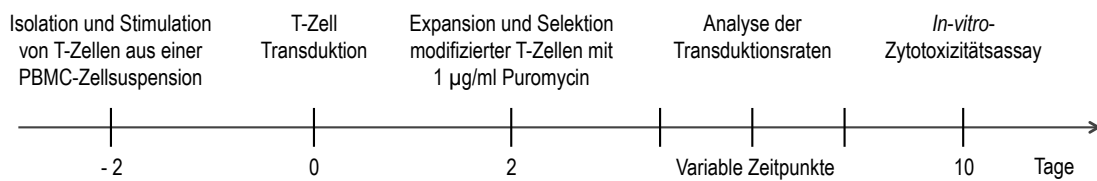


Abb. 17: Arbeitsablauf zur Charakterisierung und Testung von EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays. Primäre T-Zellen wurden mithilfe von Anti-CD3/CD28-*Beads* stimuliert und auf diese Weise aus einer PBMC-Zellsuspension gewonnen. 2 Tage nach Stimulation wurden die primären T-Zellen transduziert und anschließend unter Zusatz von IL-2 in Kultur expandiert. Transduzierte, CAR-positive T-Zellen konnten unter Zugabe von Puromycin ins Kulturmedium selektioniert werden. Ab dem vierten Tag nach Transduktion wurde der Prozentsatz transduzierter Zellen anhand der mTagBFP-Fluoreszenz in regelmäßigen Abständen ermittelt. Nach Expansion und Selektion einer Zellpopulation mit einem Anteil von mindestens 70 % mTagBFP-positiven, CAR-exprimierenden T-Zellen wurden diese 10 Tagen nach Transduktion in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays getestet.

Die den CAR kodierenden gammaretroviralen Vektoren vermitteln neben der CAR-Expression auch die Expression des Fluoreszenzproteins *Blue Fluorescent Protein* (mTagBFP) als Marker. Dadurch wird eine Identifikation und potentiell auch Selektion transduzierter, CAR-exprimierender T-Zellen anhand ihrer mTagBFP-Fluoreszenz ermöglicht. Die erfolgreiche Transduktion, Selektion und Expansion CAR-exprimierender T-Zellen unter Puromycin-Zugabe zum Kulturmedium sowie die stabile Expression der CAR an der T-Zelloberfläche wurde daher durchflusszytometrisch indirekt anhand der mTagBFP-Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 18). In vorherigen Arbeiten konnte die Expression der CAR mithilfe von Fluoreszenz-markiertem CD38 direkt nachgewiesen werden (Cichutek 2019, Hambach, Riecken et al. 2020).

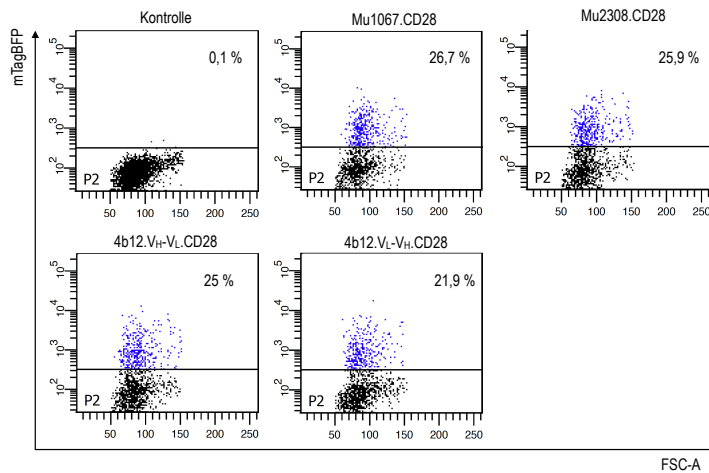


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse von primären humanen T-Zellen drei Tage nach Transduktion mit den CAR-kodierenden Vektoren. Drei Tage nach der Transduktion wurden die mit je einem der 8 verschiedenen CAR-Vektoren transduzierten Zellen analysiert. Die Vektoren vermitteln neben der Expression des jeweiligen CAR von derselben bicistronischen mRNA auch die Expression des Markergens mTagBFP. Der Nachweis der CAR-Oberflächenexpression erfolgte daher indirekt über die mTagBFP-Fluoreszenz der erfolgreich transduzierten Zellen. Der Anteil mTagBFP-positiver T-Zellen betrug 22-27 %. Es wurde jeweils der Anteil der mTagBFP-positiven Zellen der lebendigen Zellpopulation bestimmt (in blau). Als Kontrolle dienten untransduzierte T-Zellen. Mu1067: CD38-spezifische Bindedomäne, Mu2308: Toxin A-spezifische Bindedomäne, 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H: EMPD-spezifische Bindedomäne, CD28: kurzer Spacer.

Alle Proben der mit CAR-Vektoren transduzierten Zellen zeigten eine mTagBFP-positive Zellpopulation. Der Anteil mTagBFP-positiver T-Zellen 3 Tage nach erfolgter Transduktion betrug 22-27 %. Untransduzierte T-Zellen dienten als Kontrolle und wiesen erwartungsgemäß keine positiven Zellen (0,1 %) im mTagBFP-Kanal auf (Abb. 18). Nach erfolgreicher Expansion und Selektion einer Zellpopulation mit einem Anteil von mindestens 70 % mTagBFP-positiven und somit CAR-exprimierenden T-Zellen 10 Tage nach Transduktion (Abb. 19) wurden Zellen dieser Populationen hinsichtlich ihrer Antigen-Bindungsspezifität und der daraus folgenden zytotoxischen Lyseaktivität gegenüber antigentragenden Zielzellen in Zytotoxizitätsassays analysiert. Neben diesem indirekten Nachweis der CAR-Oberflächenexpression durch die mTagBFP-Fluoreszenz der CAR-T-Zellen wurde die durch den CAR übertragene Bindungsspezifität für Zellen, die die Oberflächenproteine tragen, gegen welche die Bindedomänen des CAR gerichtet ist, und die Lyseaktivität in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays als Nachweis der CAR-Oberflächenexpression und der ausgelösten Signaltransduktion gemessen.

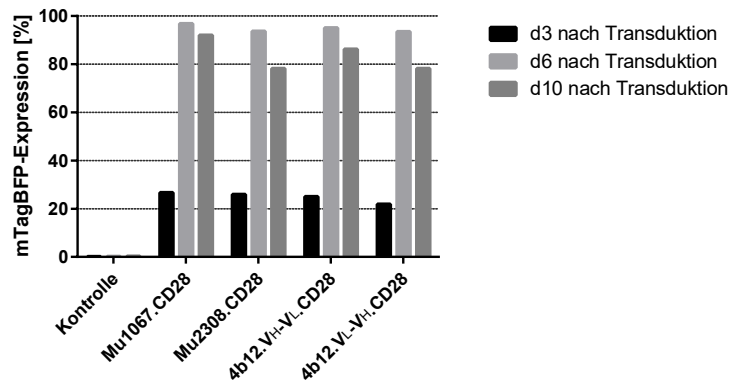


Abb. 19: Darstellung der mTagBFP-Expression der primären T-Zellen nach Transduktion mit den CAR-kodierenden Vektoren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion und unter Selektion mit 1 µg/ml Puromycin ab Tag 2 nach Transduktion. Die mTagBFP-Expression 3 Tage nach Transduktion lagen zwischen 21 % und 26 %. Nach 7 Tagen unter Selektion mit Puromycin waren bis zu 96 % der Zellen mTagBFP-positiv. Als Kontrolle dienten untransduzierte T-Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit der gleichen Menge an Virusüberstand, die einer MOI von 3 entspricht, transduziert. Mu1067: CD38-spezifische Bindedomäne, Mu2308: Toxin A-spezifische Bindedomäne, 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H: EMPD-spezifische Bindedomäne, CD28: kurzer Spacer.

4.2.3 Stabile retrovirale Transduktion von NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit CAR-kodierenden Vektoren und indirekter Nachweis der CAR-Expression

Neben primären humanen T-Zellen wurden auch humane NK-92-Zellen, eine bereits in der klinischen Erprobung befindliche permanente Zelllinie, als Effektorzellen zur Testung der verschiedenen CAR verwendet. Die Infusion von autologen, genmodifizierten CAR-T-Zellen stellt das derzeitige Konzept der CAR-Immuntherapie dar. Jedoch weisen Zellen einer etablierten Zelllinie Vorteile gegenüber primären Zellen auf. Der Vorteil von NK-92-Zellen gegenüber primären Zellen in der Verwendung als CAR-Effektorzellen ist die weniger anspruchsvolle und kostengünstige Transduktion und Expansion der Zellen in Kultur und der folglich effizienteren *off-the-shelf*-Herstellung der dann für eine allogene Anwendung vorbereiteten CAR-NK-92-Zellen für die Therapie. Derzeit werden CAR-NK-92-Zellen in einer klinischen Phase-I-Studie geprüft (Tang et al. 2018).

Nach der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Vorgehensweise wurden CAR-exprimierende NK-92-Zelllinien hergestellt, die jeweils eine von 4 verschiedenen Bindedomänen im CAR enthielten: NK-92^{4b12.VH-VL} und NK-92^{4b12.VL-VH} enthielten in ihrer

Antigenbindedomäne die EMPD-spezifischen scFv 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H. Gegen Toxin A gerichtete NK-92^{Mu2308}-Zellen dienten als Negativ-Kontrollen in Zytotoxizitätsassays. NK-92^{Mu1067}-Zellen, die als Positiv-Kontrolle dienten, enthielten in der Bindedomäne ihres CAR den gegen das Oberflächenprotein CD38 gerichteten Nanobody Mu1067. CD38 kommt neben verschiedenen Zellen der myeloischen und lymphatischen Linie auch auf NK-Zellen und T-Zellen vor. Um aber eine Auto-Lyse der CD38-spezifischen CAR-NK-92-Zellen untereinander zu verhindern, wurden in allen Experimenten NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen verwendet, deren CD38-Expression durch eine CRISPR/Cas9-vermittelte Inaktivierung des CD38-Gens fehlte (Hambach, Riecken et al. 2020).

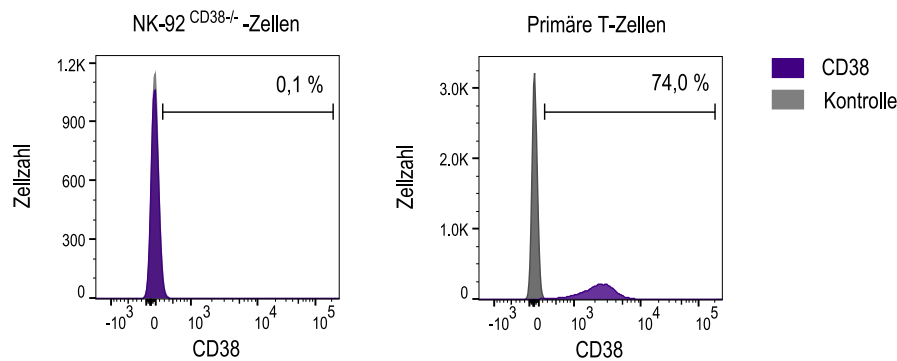


Abb. 20: Durchflusszytometrische Analyse der CD38-Oberflächenexpression auf NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und primären T-Zellen im Vergleich. NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen stellten sich in der Analyse der CD38-Oberflächenexpression als CD38-negative Zellen dar (links), primäre humane T-Zellen aus dem peripheren Blut eines Spenders waren CD38-positiv (rechts). Für die Färbung der Zellen wurde ein CD38-spezifischer Antikörper verwendet (violette Fläche). Als Kontrolle dienten mit der Isotypkontrolle gefärbte Zellen (graue Fläche).

Die durch CRISPR/Cas9-Geneditierung erreichte CD38-Negativität der NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen wurde bestätigt (Abb. 20), die NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen stellten sich in der Analyse der CD38-Oberflächenexpression als CD38-negative Zellen dar. Die ebenfalls analysierten primären humanen T-Zellen aus dem peripheren Blut eines Spenders waren dagegen erwartungsgemäß CD38-positiv. Die CD38-Expressionsstärke kann jedoch abhängig vom Spender und Aktivierungszustand oder Reifegrad der T-Zellen variieren (Malavasi et al. 2008).

Weiterhin wurden je Antigen-spezifität zwei unterschiedliche CAR-Konstrukte untersucht, die sich nur in der Länge des Spacers unterschieden, um mögliche Unterschiede in der Bindung des Zielantigens und der Vermittlung der Zytotoxizität zu ermitteln: einen CAR mit einem kurzen, von CD28 abgeleiteten Spacer und einen weiteren CAR mit einem längeren, von IgG4 abgeleiteten Spacer (Hinge-C_H2-C_H3). Die gammaretroviralen Ausgangsvektoren, kodierend für einen CAR mit kurzem Spacer (pRSF91.CAR-T.CD28.iB.pre*-CL-Puro⁺) bzw. einen CAR mit langem Spacer (pRSF91.CAR-T.h23C.iB.pre*-CL-Puro⁺), wurden entsprechend in je 4 Versionen, jeweils mit den 4 verschiedenen scFv- bzw. Nanobody-basierten Bindedomänen kloniert. Hierzu wurden die EMPD-spezifischen 4b12-scFv beider Konfigurationen (4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H) und die Kontroll-CAR-Bindedomänen Mu1067 und Mu2308 als Bindedomäne in das CAR-Konstrukt kloniert und zur Herstellung von Vektorpartikeln verwendet. Die hergestellten Vektorpartikel wurden zur Transduktion von NK-92-Zellen verwendet. Aufgrund des Vorhandenseins eines im CAR-Vektor enthaltenen Resistenzgens für Puromycin war es anschließend möglich, die erfolgreich transduzierten, CAR-positiven NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zu selektionieren und in Kultur zu expandieren.

Vier Tage nach Transduktion erfolgte eine erste durchflusszytometrische Analyse der transduzierten NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen, um die Expression des CAR in den erfolgreich transduzierten Zellen nachzuweisen. Hierfür wurde der Anteil CAR-positiver NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen in der Zellsuspension anhand des zusätzlich zum CAR exprimierten Markergens (mTagBFP) ermittelt und die Transduktionsraten der 8 verschiedenen CAR-Vektoren bestimmt. Anschließend erfolgte eine Selektion der transduzierten Zellen unter Zugabe von Puromycin zum Kulturmedium.

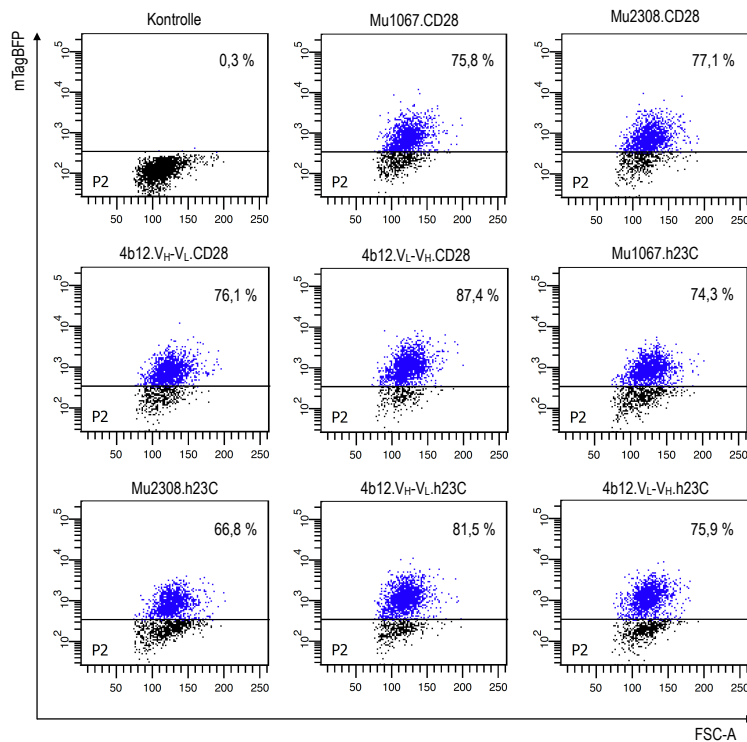


Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse von NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen 10 Tage nach Transduktion mit unterschiedlichen CAR-kodierenden Vektoren und nach 7-tägiger Selektion mit Puromycin. Die erfolgreiche Transduktion der NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit den angegebenen CAR-Vektoren konnte anhand der blauen Fluoreszenz des Markergens mTagBFP nachgewiesen werden. Auch die Expression des CAR wurde auf diese Weise indirekt nachgewiesen, da der CAR und das Markergen von derselben mRNA aus translatiert werden. Es wurde jeweils der Anteil der mTagBFP-positiven Zellen 10 Tage nach Transduktion mit den jeweiligen Vektorpartikeln bestimmt (blau). Der Anteil mTagBFP-positiver Zellen betrug zwischen 66-87 %. Als Kontrolle dienten untransduzierte NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen. Mu1067: CD38-spezifische Bindedomäne, Mu2308: Toxin A-spezifische Bindedomäne, 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H: EMPD-spezifische Bindedomäne, CD28: von CD28 abgeleiteter kurzer Spacer, h23C: von IgG4 abgeleiteter langer Spacer (Hinge-C_H2-C_H3).

Abb. 21 zeigt den Anteil jeweils erfolgreich transduzierter Zellen als Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Fluoreszenz aufgrund der Expression des Markergens mTagBFP, was mit der Oberflächenexpression des jeweiligen CAR in den transduzierten NK-92-Zellen qualitativ wie quantitativ korrelieren sollte. Der Anteil mTagBFP-positiver und damit CAR-exprimierender NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen 10 Tagen nach Transduktion und nach 7 Tagen unter Selektion mit 2 µg/ml Puromycin im Zellmedium betrug zwischen 66 % und 87 %. Als Kontrolle dienten untransduzierte NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen (0,3 % Hintergrund-Fluoreszenz). Diese Ergebnisse zeigten die effektive

Transduktion und Selektion und damit Herstellung vektorpositiver NK-92^{CD38^{-/-}}-Effektorzellen, die neben mTagBFP auch den jeweiligen CAR exprimieren sollten.

Anhand der Expression des Fluoreszenzproteins mTagBFP wurde der Anteil mTagBFP/CAR-positiver NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion in durchflusszytometrischen Analysen bestimmt. Die Langzeitkultivierung über etwa zwei Monate zeigte eine erfolgreiche Expansion und Selektion von vektorpositiven NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellpopulationen mit einem Anteil von mindestens 70 % mTagBFP-/CAR-positiven Zellen (Abb. 22). Jede dieser Zellpopulationen wurde im Anschluss hinsichtlich ihrer zielgerichteten Zytotoxizität gegenüber antigentragenden Zielzellen in Funktionalitätstests analysiert.

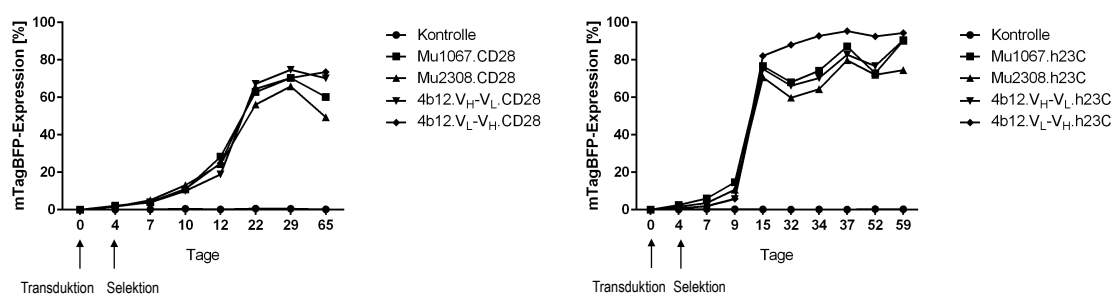


Abb. 22: Anteil mTagBFP-positiver, CAR-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen im Verlauf der Selektion mit Puromycin und Expansion in Kultur. Alle CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen waren zeitweise zu mehr als 70 % mTagBFP-positiv, gemessen bis zu 65 Tage nach Transduktion und Selektion mit Puromycin (CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit kurzem Spacer, CD28, links) bzw. 59 Tage nach Transduktion und Selektion mit Puromycin (CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit langem Spacer, h23C, rechts) auf. Mu1067: CD38-spezifische Bindedomäne, Mu2308: Toxin A-spezifische Bindedomäne, 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H: EMPD-spezifische Bindedomäne.

4.3 Vergleichende *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays der EMPD-spezifischen CAR

Nach erfolgreicher Konstruktion der gammaretroviralen CAR-kodierenden Vektoren, Transduktion der NK-92- und T-Zellen, Expansion dieser genetisch modifizierten Effektorzellen und Nachweis von mehr als 70 % mTagBFP-Positivität wurden die verschiedenen CAR-exprimierenden Effektorzellen in *In-vitro*-Assays funktionell charakterisiert. Hierfür wurde die Zellyseaktivität der EMPD-spezifischen, CAR-

exprimierenden Effektorzellen gegenüber EMPD-positiven Zielzellen in Lumineszenz-basierten Zytotoxizitätsassays getestet (3.2.11). Die in dieser Arbeit experimentell zu verifizierende Hypothese besagt, dass EMPD-spezifische CAR-Effektorzellen mIgE_L auf der Oberfläche von IgE-exprimierenden humanen Zielzellen anhand der spezifischen Bindung an die EMPD erkennen und abtöten können.

Verglichen wurde die Zytotoxizität von Effektorzellen mit den in Tab. 2 aufgezählten CAR, die sich in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden, gegenüber EMPD-positiven Zielzellen. Untersucht werden konnte damit, ob Variationen in der Spacerlänge zwischen Transmembrandomäne und der extrazellulären Antigenbindedomäne zu Unterschieden in der zytotoxischen Aktivität der jeweiligen Effektorzellen führt. Da ein IgE mit einer Molekelmasse von 190 kDa ein relativ großes Protein ist, wurde vermutet, dass die membrannahere EMPD für CAR mit kurzem Spacer schwieriger zugänglich wäre als für CAR mit langem Spacer. Ein möglicherweise zu kurzer Spacer könnte zu einer reduzierten Zytotoxizität der entsprechenden Effektorzellen führen.

4.3.1 Zytotoxizitätsassay mit primären humanen CAR-T-Zellen und Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen

Die EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer EMPD-Bindungsspezifität und ihrer zytotoxischen Lyseaktivität gegenüber EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen getestet. Es war zuvor gezeigt worden, dass 21 % der Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen in durchflusszytometrischen Analysen EMPD-positiv waren (Abb. 14). Zur Transduktion der T-Zellen wurden die EMPD-spezifischen CARs kodierenden Vektoren genutzt, die einen CAR mit CD28-basiertem, kurzem Spacer kodierten. Als Kontrollen wurden einerseits mIgE-negative Zielzellen (Ramos^{luc/GFP}) und mIgE-positive aber EMPD-negative Zielzellen (Ramos^{luc/GFP-hemS}) und andererseits CAR-T-Zellen gegen CD38 als Positivkontrolle (Mu1067.CD28) und CAR-T-Zellen gegen Toxin A (Mu2308.CD28) als Negativkontrolle eingesetzt (Tab. 2).

Die in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse der *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays zeigen eine spezifische und dosisabhängige Lyseaktivität der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen gegenüber EMPD-positiven Zielzellen. EMPD-tragende Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen wurden spezifisch von den CAR-T-Zellen mit EMPD-spezifischen CAR abgetötet, bezeichnet als 4b12.V_H-V_L und 4b12.V_L-V_H. Das Abtöten der EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen war mit beiden Konfigurationen des scFv, 4b12.V_H-V_L und

4b12.V_L-V_H, in den jeweiligen CAR erfolgreich, wobei die Variante CAR^{4b12.VL-VH} mit 60 ± 1 % Zielzell-Überleben eine etwas stärkere Lyseaktivität im Vergleich zu 69 ± 2 % Zielzell-Überleben des CAR^{4b12.VH-VL} bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 aufwies (Abb. 23, D). Der Anteil lysierter Zielzellen nahm, wie bei spezifischem Nachweis der Lyseaktivität zu erwarten, mit steigendem E:Z-Verhältnis zu. Die EMPD-negativen Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen (Abb. 23, C) und die mIgE-negativen Ramos^{luc/GFP}-Zellen (Abb. 23, B) wurden dagegen erwartungsgemäß nicht von den CAR^{4b12.VH-VL}- und CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen lysiert. Ebenso zeigten die EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen keine Lyseaktivität gegenüber U266^{luc/GFP}-Zellen (Abb. 23, A), die im Vergleich zu mIgE_L-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen nur eine sehr schwache mIgE_L-Expression und eine nicht detektierbare EMPD-Expression aufwiesen (Abb. 10, Abb. 14). Wie erwartet zeigten die untransduzierten T-Zellen und die als Negativkontrolle verwendeten CAR^{Mu2308}-T-Zellen in allen Fällen keine zytotoxische Aktivität, während CAR-T-Zellen, die als Positivkontrolle den CAR^{Mu1067} enthielten, in allen Fällen eine zytotoxische Aktivität gegenüber den Zielzellen aufwiesen. Die Lyseaktivität der Positivkontrolle (CAR^{Mu1067}-Zellen) reduzierte bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 die Anzahl überlebender Ramos-Zielzellen auf durchschnittlich 50 ± 18 %, bei einem E:Z-Verhältnis von 5:1 auf 15 ± 1 %, und bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 auf 9 ± 1 %. Dagegen wiesen die EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 nahezu keine Lyseaktivität auf, bei höherem E:Z-Verhältnis von 5:1 war eine maximale Lyse mit 75 ± 1 % überlebende Zielzellen, bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 sogar von 60 ± 1 % zu beobachten, sodass von einer im Vergleich mit den hier getesteten CD38-spezifischen CAR-T-Zellen geringeren zytotoxischen Effektivität der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen auszugehen ist. Die beiden Konfigurationen von V_H und V_L des scFv in der CAR-Bindedomäne zeigten eine vergleichbare Aktivität der jeweiligen CAR-T-Zellen.

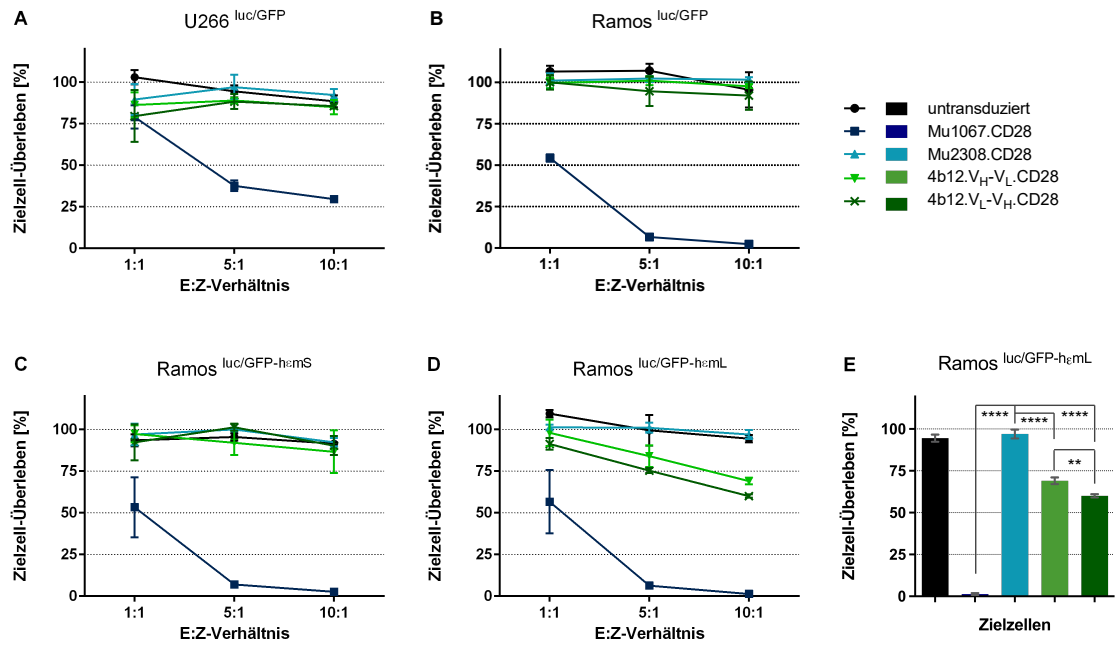


Abb. 23: In-vitro-Zytotoxizitätsassay mit EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen gerichtet gegen EMPD-positive Ramos-Zielzellen. Keine zytotoxische Aktivität der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen wurde bei natürlicherweise schwach IgE-positiven U266^{luc/GFP}-Zellen (A) und bei IgE-negativen Ramos-Zellen (B) detektiert. Erwartungsgemäß wurde auch gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen mit membranständigem, EMPD-negativem IgE (mIgEs) keine zytotoxische Aktivität detektiert (C). Gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit EMPD-positivem mIgE_L zeigte sich eine zytotoxische Aktivität der beiden EMPD-spezifischen CAR (4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H) (D). Die Negativkontrollen, untransduzierte T-Zellen und CAR-T-Zellen mit irrelevantem CAR (Mu2308) zeigten in allen Fällen keine zytotoxische Aktivität. Gegenüber allen vier Zelllinien zeigte der als Positivkontrolle dienende CD38-spezifische CAR (Mu1067) eine deutliche zytotoxische Aktivität. Alle hier verwendeten CAR enthielten den kurzen Spacer aus CD28. Die Signifikanztestung wurde mithilfe eines *one-way* ANOVA in Kombination mit einem Tukey-Test für das E:Z-Verhältnis von 10:1 durchgeführt. p-Werte < 0,01 (**), p-Werte < 0,001 (***), p-Werte < 0,0001 (****) sind signifikant und p-Werte ≥ 0,05 sind nicht signifikant (ns) (E). E:Z-Verhältnis: Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen; luc: Luciferase; hemS: mIgEs ohne EMPD; hemL: mIgE_L mit EMPD.

4.3.2 Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden primären T-Zellen und EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen

Für weitere Zytotoxizitätsassays sollten die Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen als Zielzellen eingesetzt werden, bei denen nahezu alle Zellen hohe Mengen an mIgE_L inklusive der EMPD auf der Oberfläche exprimieren. In den Zytotoxizitätsassays aus Abb. 23 wiesen nur etwa 21 % der untersuchten Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen eine Expression des Zielantigens EMPD auf (Abb. 14). Dagegen waren die Zielzellen der CD38-spezifische

CAR-T-Zellen, die eine im Vergleich deutlich erhöhte Lyseaktivität zeigten, mit nahezu 100 % zu einem größeren Anteil CD38-positiv. Die Bindungseigenschaften des im CAR enthaltenen scFv werden u.a. durch Wechselwirkungen der V_H- und V_L-Ketten miteinander und damit der Position der antigenbindenden Regionen, sogenannten *complementarity determining regions* (CDR), der variablen Domänen beeinflusst und definieren Spezifität und Affinität des CAR für sein Zielantigen. Daneben sind auch die Zielantigendichte und die Erreichbarkeit des Epitops entscheidende Faktoren für die Erkennung und Bindung des Zielantigens (Rafiq und Hackett 2020). Um einen höheren Anteil EMPD-positiver Zielzellen zu gewinnen und um die Auswirkungen einer erhöhten Zielantigendichte der Zielzellen auf die spezifische Zytotoxizität der CAR-T-Zellen zu untersuchen, wurden EMPD-hochpositive Zielzellen in Zytotoxizitätsassays verwendet. Zellen der Zelllinie Ramos^{luc/GFP-hemL} wurden dazu mithilfe Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung hinsichtlich ihrer EMPD-Expression sortiert. Die nach Antikörperfärbung am stärksten EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, etwa 5 % aller Zellen, wurden nach durchflusszytometrischer Sortierung in Kultur expandiert.

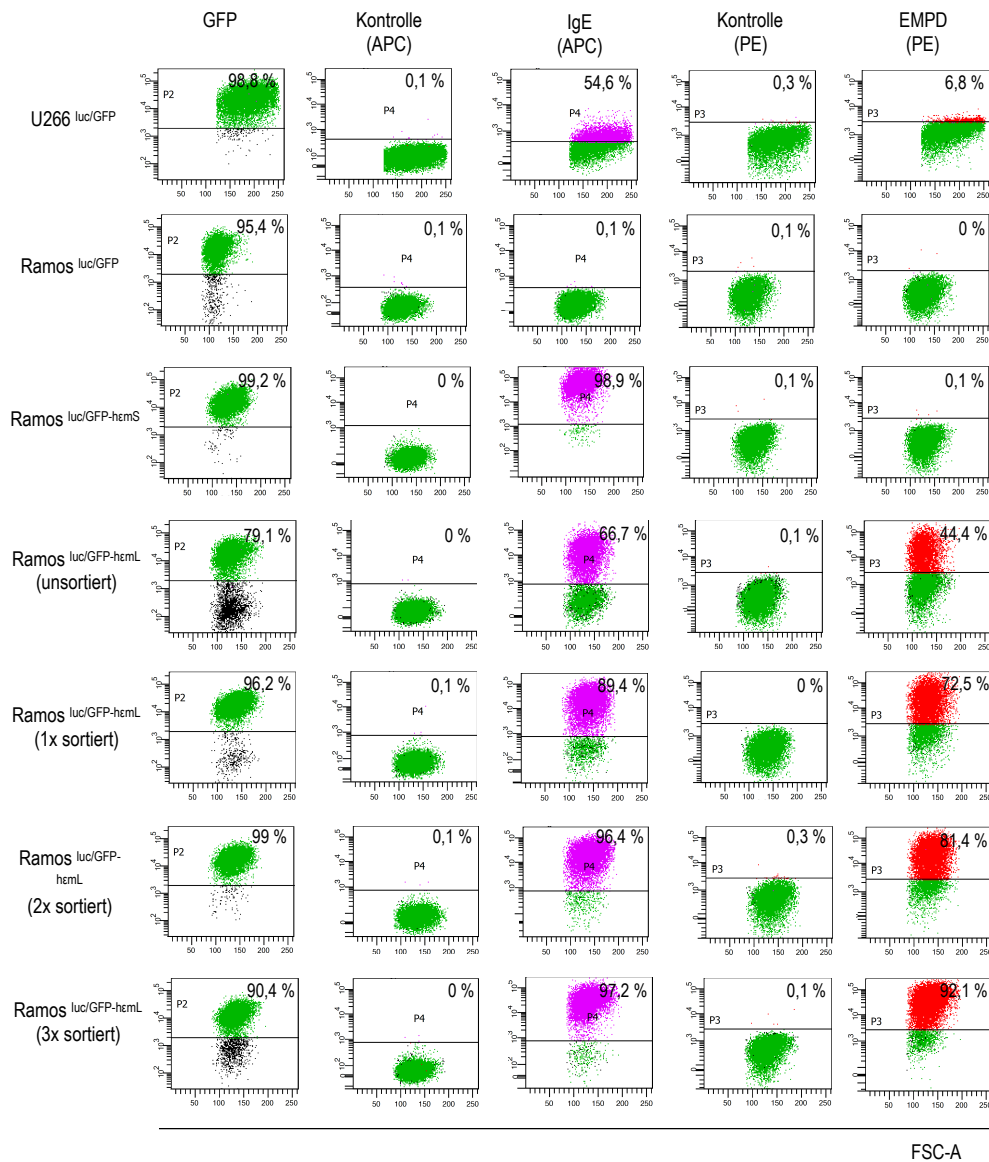


Abb. 24: Anteil EMPD-positiver Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen vor und nach dreifacher Zellsortierung von EMPD-hochpositiven Zellen aus der Ausgangs-Zellpopulation. Nach mehrfacher Sortierung von EMPD-exprimierenden IgE-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen war eine Selektion einer stark EMPD-positiven Zellpopulation erfolgreich, was an der Verschiebung zu höheren Positivitätswerten der rot gekennzeichneten Zellpopulation erkennbar war. Sowohl der Anteil EMPD-positiver Zellen, als auch die durchschnittliche Expressionsstärke konnte gesteigert werden. Die Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen waren zu 44 % EMPD-positiv (4. Zeile, unsortiert), nach erster Zellsortierung wiesen 72,5 % der Zellen eine EMPD-Expression auf (5. Zeile, einfach sortiert). Nach einer zweiten Zellsortierung waren 81,4 % aller Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen deutlich EMPD-positiv (6. Zeile, zweifach sortiert). Nach dritter Zellsortierung waren mit 92,1 % nahezu alle Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen EMPD-positiv (7. Zeile, dreifach sortiert). U266^{luc/GFP}-Zellen wiesen eine niedrige EMPD-Expression von 6,8 % auf (1. Zeile). Ramos^{luc/GFP}-Zellen und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen zeigten keine EMPD-Expression (2. und 3. Zeile). U266-, Ramos^{luc/GFP-hemL}- und Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen waren ebenfalls positiv für IgE. Die verwendeten Vektoren für die Expression von Luciferase, eGFP, mIgEs, mIgEL und Antibiotikaresistenzen sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt.

Die zweifach auf EMPD-Positivität sortierten und daher EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen wurden im Zytotoxizitätsassay als Zielzellen eingesetzt. Die dem Experiment zugrunde liegende Hypothese besagte, dass EMPD-spezifische CAR-T-Zellen den Großteil ihrer Zielzellen erkennen und abtöten, solange die Zielzellpopulation, die im *In-vitro*-Zytotoxizitätsassay eingesetzt würde, in großem Anteil EMPD-positiv ist und wenn viele dieser Zielzellen zudem das Zielantigen in erhöhter Anzahl auf ihrer Oberflächen tragen würden. Weiterhin sollte der Effekt eines höheren E:Z-Verhältnisses auf die spezifische Lyseaktivität der CAR-T-Zellen untersucht werden. Daher wurde zusätzlich ein E:Z-Verhältnis von 20:1 eingesetzt.

In Zytotoxizitätsassays mit CAR-T-Zellen, die gegen EMPD-hochpositive Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen eingesetzt wurden, wurde durch die EMPD-spezifischen CAR eine spezifische Lyse von 75 ± 5 % der Zielzellen durch CAR^{4b12.VL-VH} und von 28 ± 1 % durch CAR^{4b12.VH-VL}-T-Zellen bei einem E:Z-Verhältnis von 20:1 detektiert. Bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 belief sich dagegen die spezifische Lyse auf nur 54 ± 2 % durch CAR^{4b12.VL-VH}- und von 30 ± 2 % durch CAR^{4b12.VH-VL}-T-Zellen. Im Vergleich dazu wurden bei einem gleichem E:Z-Verhältnis von 10:1 in Abb. 23 die nicht mehrfach sortierten Ramos^{luc/GFP-hemL} nur zu 40 ± 1 % durch CAR^{4b12.VL-VH}- und zu 31 ± 2 % durch CAR^{4b12.VH-VL}-T-Zellen lysiert.

Die Spezifität der Lyseaktivität wurde durch die fehlende Lyseaktivität gegenüber den EMPD-negativen Zellen, Ramos^{luc/GFP-hemS} und Ramos^{luc/GFP}, bestätigt. Zusätzlich zeigten die Negativkontrollen, untransduzierte T-Zellen und CAR-T-Zellen mit dem irrelevanten CAR^{Mu2308}, keine Lyseaktivität (Abb. 25). In dem Zytotoxizitätsassay wurde auf die Positiv-Kontrolle, CD38-spezifische CAR^{Mu1067}-T-Zellen, aufgrund der ebenfalls auf T-Zellen vorhandenen CD38-Expression verzichtet. Die primären humanen T-Zellen aus dem peripheren Blut eines Spenders zeigten sich in vorangehenden Analysen CD38-positiv (Abb. 20). Die CD38-Expressionsstärke kann abhängig vom Spender und Aktivierungszustand auf den T-Zellen variieren und führte in diesem Versuch zu einer Auto-Lyse der CD38-spezifischen CAR^{Mu1067}-T-Zellen untereinander.

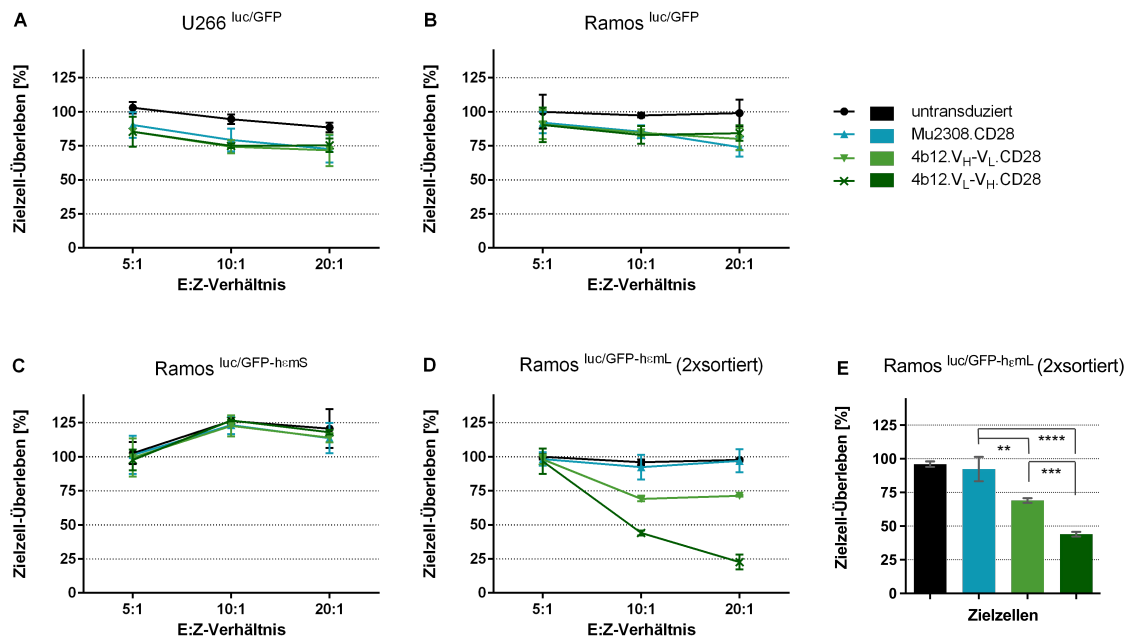


Abb. 25: In-vitro-Zytotoxizitätsassay mit EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen als Effektorzellen und EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen. Gegenüber den gering mIgE_L-positiven U266^{luc/GFP}-Zellen (A) und den mIgE-negativen Ramos^{luc/GFP}-Zellen (B) wurde erwartungsgemäß keine zytotoxische Aktivität der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen detektiert (68-100 % Zielzell-Überleben bei 5:1-E:Z-Verhältnis, keine Abnahme bei höheren E:Z-Verhältnissen). Der geringe Rückgang lebendiger Zielzellen im Assay auf etwa 75 ± 5 % in A und B wurde als assaybedingter Rückgang des Anteils überlebender Zellen durch Autolyse gewertet. Bei den zweifach sortierten, EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen, die EMPD-positives mIgE_L exprimieren, zeigte sich bei E:Z-Verhältnissen von 10:1 und 20:1 eine hohe zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen mit EMPD-spezifischen CAR, bei einem 20:1-Verhältnis auf 75 ± 5 % überlebende Zellen mit der CAR-scFv-Konfiguration V_H-V_L und auf 25 ± 1 % überlebende Zellen mit der CAR-scFv-Konfiguration V_L-V_H (D). Die EMPD-negativen, IgE-positiven Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zielzellen wurden nicht durch die EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen abgetötet (C). In den Negativkontrollen, untransduzierten T-Zellen und CAR-T-Zellen mit dem irrelevanten CAR^{Mu2308}, wurde in allen Fällen keine zytotoxische Aktivität detektiert. Eine Positivkontrolle mit CD38-spezifischen CAR^{Mu1067}-Zellen wurde bei diesem Experiment nicht mitgeführt. Die Signifikanztestung wurde mithilfe eines *one-way* ANOVA in Kombination mit einem Tukey-Test für das E:Z-Verhältnis von 10:1 durchgeführt. p-Werte < 0,01 (**), p-Werte < 0,001 (***), p-Werte < 0,0001 (****) sind signifikant und p-Werte ≥ 0,05 sind nicht signifikant (ns) (E). E:Z-Verhältnis: Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen; luc: Luciferase; hemS: mIgEs ohne EMPD; hemL: mIgE_L mit EMPD.

Diese Ergebnisse bestätigen die spezifische CAR-abhängige zelluläre Zytotoxizität von EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen gegenüber EMPD-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, die bereits in den in Abb. 23 dargestellten Experimenten gezeigt wurde. Im Vergleich zeigte sich eine deutlich stärkere, dosisabhängige Lyseaktivität bei einem erhöhten E:Z-Verhältnis von 20:1. Weiterhin wurde die Hypothese bestätigt, dass ein höherer Anteil EMPD-positiver Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen sowie eine höhere Expressionsstärke der EMPD auf den Zellen, im Vergleich zu Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit geringerer EMPD-Expression, in höherem Maße von den spezifischen CAR-T-Zellen erkannt und lysiert werden. Die CAR-T-Zellen mit V_L-V_H-Konfiguration des scFv in der CAR-Bindedomäne zeigten eine höhere Aktivität im Vergleich zur V_H-V_L-Konfiguration.

4.3.3 Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen

Neben primären T-Zellen wurden auch NK-92-Zellen als CAR-Effektorzellen in analogen Zytotoxizitätsassays erprobt. Hier konnte ebenfalls eine spezifische und dosisabhängige zytotoxische Aktivität der NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit EMPD-spezifischem CAR nachgewiesen werden (Abb. 26). Es wurden selektiv diejenigen Zielzellen abgetötet, welche das Zielantigen des CAR^{4b12.VH-VL} bzw. CAR^{4b12.VL-VH}, die EMPD im mIgE_L, exprimierten. Auch bei der Verwendung von NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zeigte der CAR^{4b12.VL-VH} eine stärkere Lyseaktivität als der CAR^{4b12.VH-VL} (Abb. 26), was im Einklang mit den Experimenten mit primären T-Zellen steht (Abb. 25). Die Lyse der Zielzellen erfolgte auch hier in Abhängigkeit vom E:Z-Verhältnis. Die Funktionalität von NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen als CAR-Effektorzellen konnte somit nachgewiesen werden.

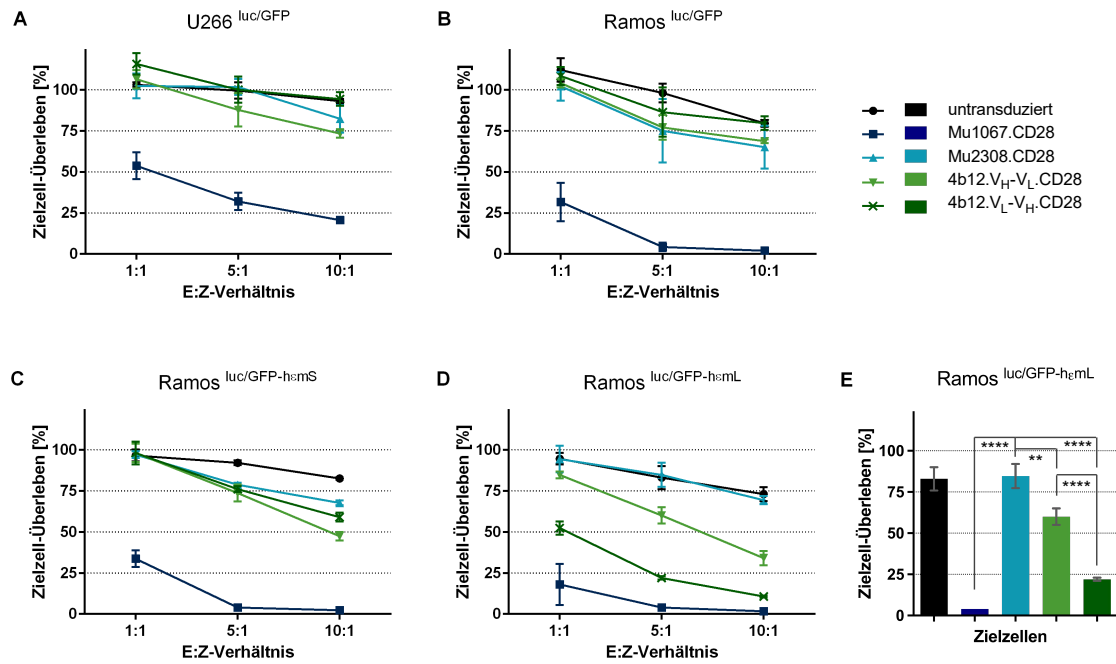


Abb. 26: *In-vitro*-Zytotoxizitätsassay mit EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen als Effektorzellen und EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zielzellen. Gegenüber gering EMPD-positiven U266^{luc/GFP}-Zellen (A), EMPD-negativen Ramos-Zellen (B) und EMPD-negativen Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen (C) zeigten die NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen eine unspezifische Lyse der Zielzellen von bis zu 30 %. Auch die CAR^{Mu2308}-NK-92-Zellen, die einen irrelevanten CAR exprimieren (Negativkontrolle), zeigten eine vergleichbare unspezifische Lyseaktivität. Bei EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen zeigte sich bei E:Z-Verhältnissen von 5:1 und 10:1 eine hohe Lyseaktivität der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit den EMPD-spezifischen CAR 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H (D). Die Lyse durch CAR^{4b12.V_L-V_H}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen war dabei höher als durch CAR^{4b12.V_H-V_L}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen. Die Negativkontrollen, untransduzierte NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und CAR^{Mu2308}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen, zeigten eine unspezifische Lyseaktivität von bis zu 30 %. Die Signifikanztestung wurde mithilfe eines *one-way* ANOVA in Kombination mit einem Tukey-Test für das E:Z-Verhältnis von 10:1 durchgeführt. p-Werte < 0,01 (**), p-Werte < 0,001 (***), p-Werte < 0,0001 (****) sind signifikant und p-Werte ≥ 0,05 sind nicht signifikant (ns) (E). E:Z-Verhältnis: Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen; luc: Luciferase; hemS: mIgEs ohne EMPD; hemL: mIgE_L mit EMPD.

4.3.4 Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen gerichtet gegen Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit unterschiedlich hohen EMPD-Expressionsniveaus

Es wurden Zytotoxizitätsassay mit CAR-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit unterschiedlich hohen EMPD-Expressionsniveaus durchgeführt (Abb. 24). Damit sollte die Abhängigkeit der Lyseaktivität der CAR-Effektorzellen von der Zielantigendichte auf den Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen untersucht werden. Im vorherigen Abschnitt 4.3.3 konnte bereits nachgewiesen werden, dass EMPD-hochpositive Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen durch CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen bei erhöhtem E:Z-Verhältnis von 10:1 nahezu vollständig lysiert wurden.

In dem in Abb. 27 gezeigten Zytotoxizitätsassay wurden CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit einer geringen, mittleren und hohen EMPD-Expression untersucht. Gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit hoher EMPD-Expression zeigten CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen eine höhere zytotoxische Aktivität als gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit mittlerer oder geringer EMPD-Expression. Bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 wurden gering EMPD-exprimierende Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen (unsortiert) zu 44 ± 1 % lysiert und Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen (2x sortiert) mit mittlerer EMPD-Expression zu 77 ± 7 %. Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen (3x sortiert) mit hoher EMPD-Expression wurden bereits bei einem E:Z-Verhältnis von 5:1 zu 75 ± 1 %, bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 vollständig lysiert. Damit wurde die zytotoxische Aktivität der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen in Abhängigkeit vom Anteil EMPD-positiver Zielzellen und von der EMPD-Expressionsstärke dieser Zellen gezeigt, was als ein weiterer Nachweis der EMPD-spezifischen zytotoxischen Aktivität von CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zu werten ist.

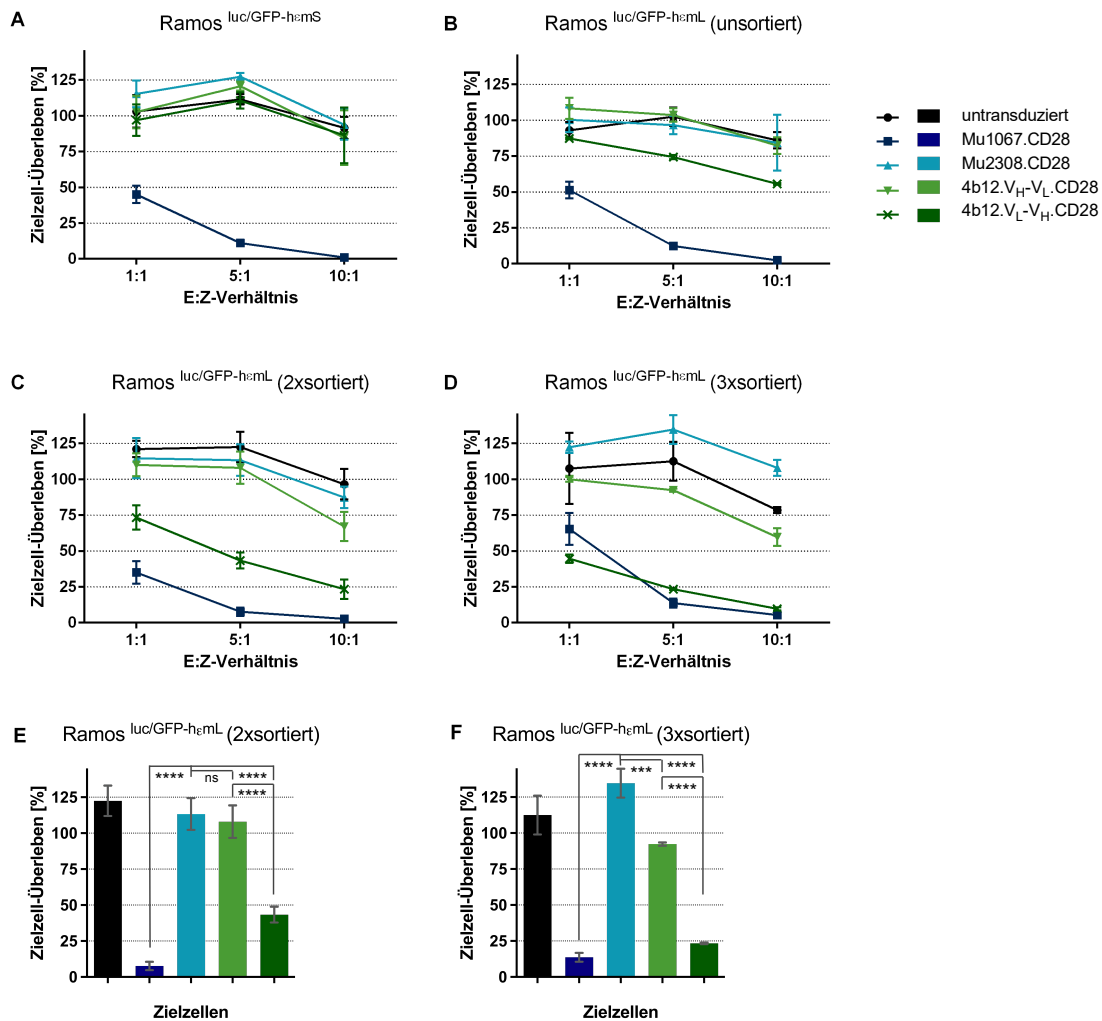


Abb. 27: *In-vitro*-Zytotoxizitätsassay mit EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen als Effektorzellen und Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit unterschiedlich hohen Expressionsniveaus als Zielzellen. EMPD-spezifische CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zeigten gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen eine spezifische Lyseaktivität, die sich in Abhängigkeit vom Anteil EMPD-positiver Zellen und der Zielantigendichte gesteigert zeigte. EMPD-negative Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen wurden nicht durch die EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen abgetötet (A). Die EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zeigten bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL} (unsortiert)-Zellen mit geringer EMPD-Expression eine spezifische Lyse von 44 ± 1 % (B) und gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL} (2x sortiert)-Zellen mit mittlerer EMPD-Expression eine spezifische Lyse von 77 ± 7 % (C). Ramos^{luc/GFP-hemL} (3x sortiert)-Zellen mit hoher EMPD-Expression wurden bereits bei einem E:Z-Verhältnis von 5:1 zu 75 ± 1 % und bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 vollständig lysiert (D). In den Negativkontrollen, untransduzierten NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit dem irrelevanten CAR^{Mu2308}, wurde in allen Fällen keine zytotoxische Aktivität detektiert. Die Signifikanztestung wurde mithilfe eines *one-way* ANOVA in Kombination mit einem Tukey-Test für das E:Z-Verhältnis von 5:1 durchgeführt. p-Werte < 0,01 (**), p-Werte < 0,001 (***), p-Werte < 0,0001 (****) sind signifikant und p-Werte ≥ 0,05 sind nicht signifikant (ns) (E, F). E:Z-Verhältnis: Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen; luc: Luciferase; hemS: mIgEs ohne EMPD; hemL: mIgEL mit EMPD.

4.3.5 Vergleichende Zytotoxizitätsassays mit NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit CAR mit unterschiedlicher Spacerlänge zwischen Transmembrandomäne und Bindedomäne

Als nächstes wurden EMPD-spezifische CAR-exprimierende NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit einem kurzen CD28- und einem langen IgG4-abgeleiteten (h23C) Spacer vergleichend in Zytotoxizitätsassays untersucht. Als Zielzellen wurden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen verwendet, die zu einem hohen Anteil von 92 % EMPD-hochpositiv waren (Abb. 24, Ramos^{luc/GFP-hemL}, 3x sortiert). Als Kontrollen wurden Positiv- (Mu1067) und Negativ- (Mu2308) Kontroll-CAR-exprimierende sowie untransduzierte NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen eingesetzt. Die in Abb. 28 dargestellten Ergebnisse zeigten eine Lyseaktivität der EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen (4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H) mit kurzem sowie mit langem Spacer gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen. Jedoch wurde kein signifikanter Unterschied in der zytotoxischen Aktivität der CAR-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit verschieden langen Spacern beobachtet. Bei einem E:Z-Verhältnis von 5:1 wurden 50 ± 16 % der Zielzellen, bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 75 ± 21 % durch CAR^{4b12.V_L-V_H} mit kurzem Spacer abgetötet, während 55 ± 12 % bei einem E:Z-Verhältnis von 5:1 und 75 ± 2 % der Zielzellen bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 durch CAR^{4b12.V_L-V_H} mit langem Spacer abgetötet wurden. Damit ist davon auszugehen, dass beide CAR unabhängig von der hier untersuchten Länge des Spacers in der Lage sind, das Zielepitop zu erreichen und daran zu binden und nachfolgend eine Lyse der Zielzelle zu induzieren.

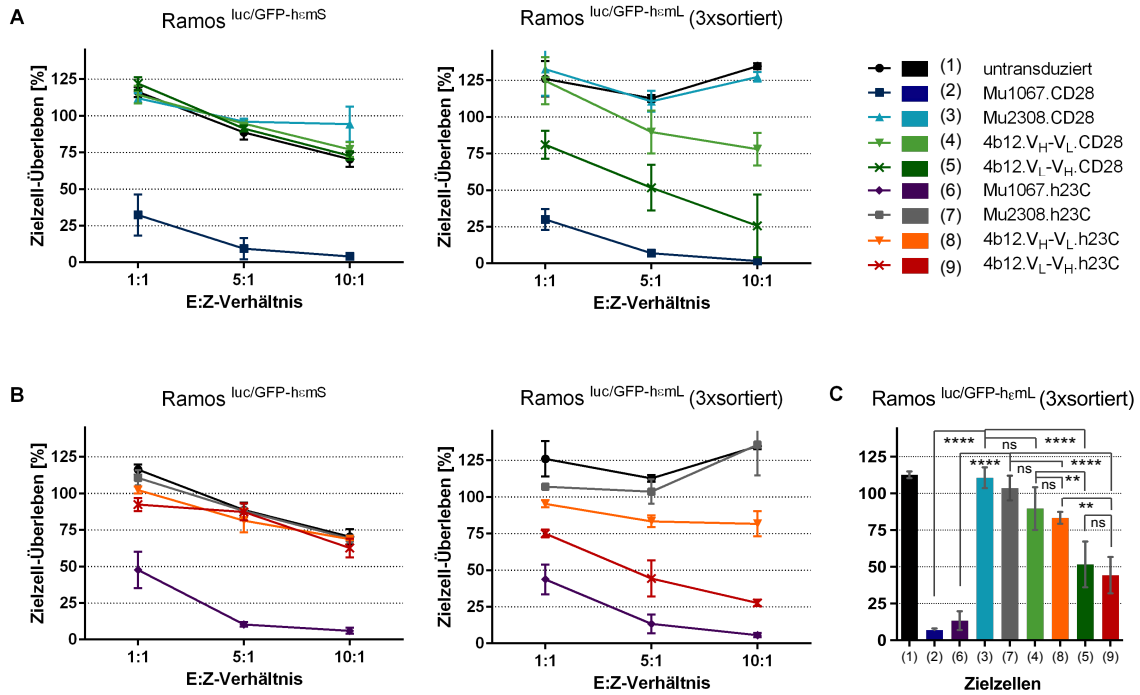


Abb. 28: Vergleichende *In-vitro*-Zytotoxizitätsanalyse EMPD-spezifischer CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit kurzem (A) und langem Spacer (B) gegenüber EMPD-hochpositiven Ramos^{luc/GFP-h-mL}-Zielzellen. Die spezifische Lyse der EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-h-mL}-Zellen war mit beiden Längen des Spacers im CAR erfolgreich. Es wurde kein Unterschied in der zytotoxischen Aktivität der CAR^{4b12.VH-VL}- bzw. CAR^{4b12.VL-VH}-exprimierenden NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit kurzem Spacer (A, rechts) und mit langem Spacern (B, rechts) deutlich. Die Positivkontrolle mit kurzem und langem Spacer zeigte in beiden Fällen eine zytotoxische Aktivität (Mu1067, ein gegen CD38 gerichteter CAR). Untransduzierte NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen und Negativ-Kontroll-CAR^{Mu2308}-exprimierende NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen zeigen in beiden Fällen keine zytotoxische Aktivität. Die Signifikanztestung wurde mithilfe eines *one-way* ANOVA in Kombination mit einem Tukey-Test für ein E:Z-Verhältnis von 5:1 durchgeführt (C). p-Werte < 0,01 (**), p-Werte < 0,001 (***) , p-Werte < 0,0001 (****) sind signifikant und p-Werte ≥ 0,05 sind nicht signifikant (ns). E:Z-Verhältnis: Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen; luc: Luciferase; mIgEs ohne EMPD; h-mL: mIgEL mit EMPD.

5 Diskussion

IgE hat eine zentrale Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen, daher könnte die Hemmung der IgE-Produktion durch Abtötung der IgE-exprimierenden B-Zellen und Plasmazellen einen wirksamen therapeutischen Ansatz darstellen, um eine langfristige Symptomminderung durch Unterdrückung der IgE-vermittelten allergischen Entzündungsreaktionen zu erreichen. Das auf Basis des vorliegenden präklinischen Forschungsprojekts zu entwickelnde Therapiekonzept für schwere Allergien beruht auf dem Prinzip der adoptiven Immuntherapie mit Hilfe autologer CAR-T-Zellen. IgE-produzierende B- und Plasmazellen zeichnen sich durch mIgE_L auf der Zelloberfläche aus, die extrazellulär eine EMPD enthalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass humane EMPD-spezifische CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen in der Lage sind, spezifisch an humane IgE-exprimierende B-Zellen über die Erkennung der EMPD des mIgE_L zu binden und diese B-Zellen abzutöten. Bei Einsatz solcher EMPD-spezifischer CAR-Effektorzellen sollte die Bildung neuer löslicher IgE, die von EMPD-positiven, mIgE_L-exprimierenden Zellen sezerniert werden, unterbunden und die Allergiesymptomatik langfristig reduziert oder sogar aufgehoben werden.

5.1 Erfolgreiche Konstruktion EMPD-spezifischer CAR und Herstellung von humanen CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen

Um EMPD-spezifische CAR-Effektorzellen hinsichtlich ihrer zielgerichteten zytotoxischen Aktivität gegenüber antigentragenden Zielzellen *in vitro* testen zu können, wurde zuerst eine definierte Testumgebung etabliert. Auf Basis der humanen B-Zelllinie Ramos wurden Zielzellen hergestellt, die nach Transduktion mit den entsprechenden retroviralen Zielzell-Vektoren 1) mIgE_L inklusive EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemL}) und 2) mIgE_s ohne EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemS}) exprimierten (Abb. 7). Nach mehrfacher Zellsortierung von EMPD-hochexprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen war die Selektion einer zu 92,1 % EMPD-positiven Zellpopulation erfolgreich (Abb. 24). Die natürlicherweise schwach IgE-exprimierenden U266-Zellen sowie parentale Ramos^{luc/GFP}-Zellen wurden als Kontrollen eingesetzt (Abb. 10). Alle Zielzellen exprimierten Luciferase als Reporter für die Vitalität der Zellen in Zytotoxizitätsassays und GFP als Marker in Fluoreszenz-basierten Analysen (Abb. 6).

Um CAR herzustellen, die eine spezifisch gegen die EMPD gerichtete Bindedomäne enthalten, wurde die cDNA eines scFv in zwei Konfigurationen von dem EMPD-spezifischen, humanisierten Antikörper 4b12 abgeleitet (Chen, Wu et al. 2010): 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H. Es wurden zwei verschiedene Konfigurationen des scFv im CAR getestet, da sich die Bindungseigenschaft und -affinität eines scFv abhängig von der Positionierung der V_H- und V_L-Kette zueinander im Vergleich zur der des ursprünglichen Antikörpers verändern kann (Krokhotin et al. 2019). Mit beiden 4b12-scFv wurden neue EMPD-spezifische CAR in gammaretrovirale Vektoren kloniert, zur Herstellung retroviraler Vektorpartikel für den Gentransfer in humane Zellen und damit zur Herstellung von EMPD-spezifischen CAR-exprimierenden Effektorzellen eingesetzt.

Als Effektorzellen wurden neben autologen T-Zellen von Spendern auch Zellen der Zelllinie NK-92 im Hinblick auf ihren möglichen zukünftigen Einsatz als allogene CAR-NK-Zellen zur Therapie schwerer allergischer Erkrankungen getestet. Das Prinzip der allogenen CAR-Zelltherapie mit NK-92-Zellen hat das Potenzial einer sofortigen *off-the-shelf*-Verfügbarkeit eines standardisierten CAR-Arzneimittels. Daneben könnten NK-92-Zellen im Gegensatz zu autologen T-Zellen den Vorteil bieten, dass sie aufgrund ihrer natürlichen Eigenschaften ein geringeres Nebenwirkungsspektrum aufweisen, keine *off-target*-Effekte und keine *Graft-versus-Host*-Reaktion verursachen. Genau dies wurde im Rahmen einer ersten klinischen Prüfung von NK-92-Zellen zur Therapie des *Glioblastoma multiforme* beobachtet. In dieser klinische Studie wurde die vermutete Sicherheit von bestrahlten NK-92-Zellen auch bei einmaliger Gabe hoher Dosen von 10¹⁰ NK-92-Zellen/m² Körperoberfläche vorläufig bestätigt (Suck et al. 2016, Burger et al. 2019). Insbesondere in der Therapie allergischer Erkrankungen wird es eine wichtige Rolle spielen, ob CAR-NK-92-Zellen ohne gravierende Nebenwirkungen als sichere Arzneimittel in der Therapie einer nicht-malignen und mit Ausnahme des anaphylaktischen Schocks, nicht akut lebensbedrohlichen Krankheit klinisch eingesetzt werden können.

Weiterhin kann in der CAR-Zelltherapie von allergischen Erkrankungen ein alternativer Ansatz auf Basis von autologen T-Zellen verfolgt werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Arzneimitteln stellen zellbasierte Therapien, wie die CAR-T-Zelltherapie, lebende Arzneimittel dar, somit hängt ihre klinische Wirksamkeit direkt von ihrer Persistenz, Expansion und Funktionalität *in vivo* ab. Eine fehlende Expansion

bzw. der Verlust von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen *in vivo* konnte direkt mit einem Fortschreiten oder einem Rezidiv der Krankheit in Verbindung gebracht werden (Locke et al. 2019). Bei autologen CAR-T-Zellen erhofft man sich im Allgemeinen eine lang anhaltende Wirkung aufgrund ihrer Persistenz *in vivo*. In dieser Hinsicht bieten die Langzeitergebnisse klinischer Studien mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei Patienten mit B-Zell-Leukämien und ausreichender Expansion dieser CAR-T-Zellen ermutigende Hinweise. Engraftment, Expansion und Persistenz von CAR-T-Zellen *in vivo* waren entscheidend für das Ansprechen und Outcome der CAR-T-Zelltherapie bei malignen hämatologischen Erkrankungen (Locke, Ghobadi et al. 2019, Badbaran et al. 2020). Entsprechend müsste ein Therapieansatz mit autologen CAR-T-Zellen in der Behandlung allergischer Erkrankungen die Möglichkeit der langfristigeren Hemmung der körpereigenen IgE-Produktion und folglich der allergischen Erkrankung bieten.

Dagegen zeigen allogene CAR-NK-92-Zellen gegenüber autologen CAR-T-Zellen eine deutlich reduzierte Halbwertszeit von mehreren Tagen bis wenigen Wochen *in vivo*. Zum einen begründet sich die geringe Persistenz *in vivo* mit der Immunogenität und einer daraus folgenden Immunantwort gegenüber den allogenen NK-92-Zellen durch den Empfänger (Zhang et al. 2017, Hu et al. 2018). Zum anderen werden NK-92-Zellen aufgrund ihres Ursprungs in einer Tumorzelllinie und des daraus resultierenden Risikos des unkontrollierten Wachstums nur nach Bestrahlung an Patienten angewendet. Die Bestrahlung verhindert die Proliferation der Zellen bei weiter vorhandener zytotoxischer Zellaktivität (Suck, Odendahl et al. 2016). Die Therapie einer allergischen Erkrankung mit CAR-NK-92-Zellen würde den Ansatz einer kurzandauernden Wirkung mit vollständiger Eliminierung aller IgE-produzierenden Plasmazellen sowie der IgE-exprimierenden B-Gedächtniszellen verfolgen. Damit könnte eine Heilung der Allergie für einen langen Zeitraum erreicht werden, auch wenn die Möglichkeit einer erneuten Entstehung einer Allergie besteht. Man geht jedoch davon aus, dass die Ausbildung einer Allergie nach wiederholtem Kontakt und Sensibilisierung durch ein Allergen mehrere Jahre benötigt (Lambrecht und Hammad 2017).

Als CAR-Effektorzellen wurden daher in dieser Arbeit sowohl humane primäre T-Zellen als auch NK-92-Zellen getestet. CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen wurden erfolgreich mit den neu entwickelten CAR-kodierenden Vektoren hergestellt und unter Puromycin-Zugabe zum Kulturmedium selektioniert (Abb. 19, Abb. 21). Die CAR-exprimierenden Effektorzellen weisen aufgrund des im Vektor enthaltenen Markergens

mTagBFP blaue Fluoreszenz auf, die als Nachweis für die erfolgreiche Transduktion der Ausgangszellen gilt. Indirekt war dies ebenfalls der Nachweis der CAR-Expression auf den transduzierten Zellen, da die Vektoren von derselben bicistronischen mRNA neben mTagBFP auch den jeweiligen CAR exprimierten. Nach der Selektion waren bis zu 90 % der CAR-T- und der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mTagBFP-positiv (Abb. 19, Abb. 22). Die auch nach 8 Wochen noch konstant nachweisbare Expression des Markers in den CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen in Kultur (Abb. 22), verdeutlicht die Stabilität der Expression.

5.2 Spezifische Zytotoxizität EMPD-gerichteter CAR-T-Zellen und CAR-NK-92-Zellen *in vitro*

Das Wirkprinzip der CAR-Effektorzellen soll zur selektiven und anhaltenden Abtötung von IgE-exprimierenden Zellen bei Patienten mit schweren allergischen Erkrankungen führen. Dazu wurde die EMPD als Zielantigen des CAR genutzt, um in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays eine spezifische Bindung und Eliminierung von IgE-exprimierenden Zellen durch EMPD-spezifische CAR-Effektorzellen zu untersuchen. In primären humanen T-Zellen führten die EMPD-spezifischen CAR^{4b12.VH-VL}- und CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen gegenüber den EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen zu einer spezifischen und dosisabhängigen Lyseaktivität, während die EMPD-negativen Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen erwartungsgemäß nicht lysiert wurden (Abb. 23, Abb. 25). Das Abtöten der Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen war mit beiden Konfigurationen des scFv, 4b12.VH-VL und 4b12.VL-VH, in den jeweiligen CAR erfolgreich, wobei die Variante CAR^{4b12.VL-VH} eine stärkere Lyseaktivität aufwies mit einem Zielzell-Überleben von 60 % im Vergleich zu 69 % durch den CAR^{4b12.VH-VL} bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 (Abb. 23). Gegenüber EMPD-hochexprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen zeigten die CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen sogar eine verstärkte spezifische Lyseaktivität mit einem Zielzell-Überleben von 44 % bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 und nur 23 % bei einem E:Z-Verhältnis von 20:1 (Abb. 25). CAR^{4b12.VH-VL}-T-Zellen wiesen eine im Vergleich geringere Lyseaktivität mit einem Zielzell-Überleben von 69 % bzw. 71 % bei gleichen E:Z-Verhältnissen auf. Die Negativkontrollen, untransduzierte T-Zellen sowie CAR^{Mu2308}-T-Zellen, zeigten keine Lyse der Zielzellen. Das Zielzell-Überleben lag hierbei jeweils zwischen 95-100 % (Abb. 23, Abb. 25). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen EMPD-

positive, IgE-exprimierende B-Zellen mit hoher Effizienz und Spezifität *in vitro* abtöten. Die Ergebnisse der *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays mit CAR-T-Zellen sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Untersuchung mit NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen als CAR-Effektorzellen. Auch hier zeigte sich eine spezifische Lyseaktivität der CAR^{4b12.VL-VH}- und CAR^{4b12.VH-VL}-NK-92-Zellen gegenüber Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen mit einem Zielzell-Überleben von nur 10 %, sogar bereits bei einem deutlich geringeren E:Z-Verhältnis von 10:1 statt 20:1 bei CAR-T-Zellen (Abb. 26). Die im Vergleich mit CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen hohe spezifische Zytotoxizität von CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92-Zellen bereits bei geringem E:Z-Verhältnis ist zumindest unter diesen Assaybedingungen ein erster Hinweis darauf, dass NK-92-Zellen den primären T-Zellen überlegen sein könnten.

CAR-Effektorzellen, die das scFv 4b12 in V_L-V_H-Orientierung in ihrer Bindedomänen trugen, zeigten eine stärkere Vermittlung der zytotoxischen Aktivität gegenüber Zielzellen. Das scFv 4b12.V_L-V_H der CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen vermittelte eine deutlich effektivere Abtötung der EMPD-positiven Zielzellen als das scFv 4b12.V_H-V_L in CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen. Das Zielzell-Überleben betrug nur 23 % im Vergleich zu 71 % bei einem E:Z-Verhältnis von 20:1 (Abb. 25). Auch CAR^{4b12.VH-VL}-NK-92-Zellen zeigten im Vergleich zu CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92-Zellen eine schwächere zytotoxische Aktivität gegenüber den Zielzellen mit einem Zielzell-Überleben von 34 % gegenüber 11 % bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 (Abb. 26). Daher hat sich in den hier beschriebenen Experimenten gezeigt, dass die Bindungseigenschaften und die Affinität der CAR-Bindedomänen in Abhängigkeit von der scFv-Orientierung verschieden stark sind und zu Unterschieden in der Zytotoxizität der CAR-Effektorzellen führen. Es erwiesen sich CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen und CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92-Zellen als die *in vitro* effektiveren Effektor-Zellen. Zudem waren CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92-Zellen effektiver als CAR^{4b12.VL-VH}-T-Zellen. Um die Unterschiede sicherer messen zu können, sollten beide Zelltypen in weiteren *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays gleichzeitig getestet werden, um dieses Ergebnis zu bestätigen.

5.3 Bindungseigenschaften und Optimierung der Effektivität und Wirksamkeit von CAR-Effektorzellen

5.3.1 Spezifische Erkennung der EMPD durch die Bindedomäne im CAR

In der vorliegenden Arbeit zeigten CAR-Effektorzellen, die das scFv 4b12 in V_L - V_H -Orientierung in ihrer Bindedomänen trugen, eine stärkere zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen. Auch die als Antikörper verwendeten Fusionsproteine mit *Rabbit*-Fc-Terminus, 4b12. V_L - V_H -rbFc und 4b12. V_H - V_L -rbFc, zeigten in gleicher Weise wie die CAR^{4b12. V_L - V_H} - und CAR^{4b12. V_H - V_L} -Effektorzellen Unterschiede in der Bindung an EMPD-exprimierende Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen (Abb. 14). Die Bindung des Antikörpers 4b12. V_L - V_H -rbFc an die EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen erfolgte dabei stärker (21,1 % positive Zellen) als die Bindung des Antikörpers 4b12. V_H - V_L -rbFc an die gleichen Zellen (1,3 % positive Zellen). Bei den Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen ist davon auszugehen, dass sie aufgrund des nachweislich exprimierten mIgE der langen EMPD-haltigen Isoform in gleicher Weise EMPD-positiv sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Affinität des scFv 4b12. V_L - V_H gegenüber der Zielstruktur EMPD sowohl im CAR als auch im *Rabbit*-Fc-Fusionsprotein deutlich stärker ist, verglichen mit der Affinität des scFv 4b12. V_H - V_L . In Hinblick auf einen späteren Therapieeinsatz kann daher von einer effektiveren Abtötung der EMPD-positiven Zielzellen durch CAR^{4b12. V_L - V_H} -Effektorzellen im Vergleich zu CAR^{4b12. V_H - V_L} -Effektorzellen ausgegangen werden.

Bestimmte Eigenschaften eines scFv, welches als Bindedomäne des CAR verwendet wird, können Auswirkungen auf die Funktionalität des CAR oder des Antikörpers haben, die entscheidend für das spezifische Erkennen und Binden des Zielantigens sind. scFv sind rekombinante Fusionsproteine, die aus der variablen Domäne der schweren Kette (V_H) und der leichten Kette (V_L) bestehen, wobei der C-Terminus der ersten Domäne mittels eines flexiblen Peptidlinkers mit dem N-Terminus der zweiten Domäne verbunden ist. scFv wurden sowohl in V_H - V_L - als auch in V_L - V_H -Orientierung beschrieben. Während Rajagopal *et al.* (Rajagopal et al. 1997) keinen Unterschied in der Bindungsaktivität und Expression der scFv beider Orientierungen nachweisen konnten, zeigten Desplancq *et al.* (Desplancq et al. 1994) und Luo *et al.* (Luo et al. 1995), dass die V_L - V_H -Orientierung gegenüber der V_H - V_L -Orientierung hinsichtlich Expression und Antigenbindung, auch unabhängig von der Peptidlinkerlänge, überlegen ist, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Diese unterschiedlichen

Beobachtungen lassen vermuten, dass die Orientierung des scFv im CAR und damit die Position der variablen Domänen des scFv, die die spezifische Bindung an das Epitop vermitteln, Einfluss auf die spezifische Antigenbindung und Bindungsaffinität des CAR nehmen kann. Trotz erfolgreicher Anwendungen von scFv als Bindedomäne in CAR unterscheidet sich die Bindungsaffinität des scFv häufig von der des ursprünglichen monoklonalen Antikörpers, von dem das scFv abgeleitet wurde, da eine Neuordnung der V_L- und V_H-Domänen durch einen Peptidlinker die Bindungsdynamik und relative Orientierung der Antigenbindedomänen zueinander verändern kann. Eine Aggregation oder Fehlfaltung der scFv-Domänen kann durch verringerte Stabilität der V_H- oder V_L-Domäne oder durch die Exposition von hydrophoben Resten an der V_H- bzw. V_L-Oberfläche verursacht werden und ebenfalls die Bindungsaffinität beeinflussen (Jayaraman, Mellody et al. 2020). Für das spezifische CAR-Konstrukt und dessen Zielantigen eines therapeutischen Ansatzes ist die ausreichend hohe scFv-Affinität und die damit einhergehende CAR-Funktionalität ein entscheidender Faktor hinsichtlich der effektiven und spezifischen Bindung von Zielzellen und der nachfolgenden zytotoxischen Aktivierung der CAR-T-Zelle (Rafiq und Hackett 2020).

Neben einer ausreichenden Bindungsaffinität eines CAR sind die Zielantigendichte und die strukturelle Zugänglichkeit des Zielepitops ebenfalls entscheidende Faktoren der effektiven Bindung des CAR an sein Zielantigen und die Effizienz der folgenden Zielzellabtötung. Majzner *et al.* (Majzner et al. 2018) untersuchten im Rahmen einer klinischen Studie das therapeutische Ansprechen der CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapie von B-ALL-Patienten in Abhängigkeit von der CD19-Expression auf den malignen Zellen. Sie konnten zeigen, dass Patienten, deren CD19-Expression unter einem gewissen Schwellenwert lag, ein geringeres klinisches Ansprechen erreichten als Patienten, deren maligne Zellen höhere CD19-Expressionslevel aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen ebenfalls in Abhängigkeit von der Expressionsstärke des Zielantigens EMPD auf Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen untersucht (Abb. 27). Die Interaktion zwischen den CAR-Effektorzellen und dem Zielantigen wird u.a. von der Menge der CAR-Oberflächenexpression, der Antigendichte auf Zielzellen und der Affinität der Bindedomäne beeinflusst (Jayaraman, Mellody et al. 2020). Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen wurden hinsichtlich ihrer EMPD-Expressionsstärke mehrfach sortiert und wiesen nach Mehrfachsortierung eine EMPD-Expression von 92 % und eine um Faktor 10 höhere

durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) auf (Abb. 24). In *In-vitro*-Tests korrelierte die zytotoxische Aktivität der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen mit der Höhe der EMPD-Expressionsstärke (Abb. 27). Bei dreifach sortierten, hoch EMPD-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen zeigte sich im Vergleich zu nicht-sortierten, niedrig EMPD-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen eine höhere zytotoxische Aktivität der CAR^{4b12.VL-VH}-NK-92-Zellen. CAR^{4b12.VH-VL}-NK-92-Zellen zeigten auch gegenüber hoch EMPD-exprimierenden Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen nur eine geringe zytotoxische Aktivität, sodass davon auszugehen ist, dass das scFv in der V_H-V_L-Konfiguration keine hinreichende Bindung vermittelt, um eine Aktivierung der Effektorzellen zu erreichen. Die korrekte Klonierung und Sequenz der V_H-V_L-Region im CAR war durch Sequenzierung des entsprechenden Vektors überprüft worden, steht also außer Frage (siehe Kapitel 3.2.4). Die Ergebnisse deuten an, dass die hohe EMPD-Expression nach mehrfacher Selektion der Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, die möglicherweise niedrige Affinität der 4b12-V_L-V_H-tragenden CAR-Bindedomäne oder die geringe CAR-Expressionsstärke der CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen im *In-vitro*-Zytotoxizitätsassay kompensieren konnte.

Die EMPD-spezifischen CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}- und CAR-T-Zellen zeigten gegenüber U266-Zellen, die mIgE_L inklusive EMPD nur sehr schwach an der Zelloberfläche exprimierten (Abb. 24), keine nachweisbare zytotoxische Aktivität (Abb. 25, Abb. 26). Ward *et al.* (Ward et al. 2018) konnte dagegen eine zytotoxische Aktivität von mIgE-spezifischen FcεRI-basierten CAR-T-Zellen gegenüber U266-Zellen trotz schwacher mIgE-Expression *in vitro* nachweisen. Dies legt nahe, dass bei effektiver Bindung des CAR und ausreichender CAR-Aktivierung niedrig mIgE-exprimierende Zielzellen *in vivo* eliminiert werden können. Jedoch ist nicht bekannt, ob die mIgE-Expressionsstärke der in dieser Arbeit verwendeten U266-Zellen und der in Ward *et al.* getesteten U266-Zellen identisch ist. Die Entwicklung eines scFv mit einer gegenüber der EMPD weiter gesteigerten Affinität könnte für den CAR eine erfolgversprechende Verbesserung darstellen, um die zytotoxische Aktivität der CAR-Effektorzellen gegenüber Zielzellen mit niedriger Expression der EMPD weiter zu steigern.

Caruso *et al.* (Caruso et al. 2015) verglichen EGFR-spezifische CAR-T-Zellen, deren CAR-Bindedomäne von den beiden Anti-EGFR-mAb *Cetuximab* bzw. *Nimotuzumab* abgeleitet wurde, in Bezug auf die Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität von der Antigenexpressionshöhe auf den Zielzellen und der Affinität der CAR-Bindedomäne.

Nimotuzumab wies eine 10-fach geringere Affinität für die Zielstruktur EGFR als *Cetuximab* auf. *Nimotuzumab*-basierende CAR zeigten *in vitro* eine von der EGFR-Expressionsdichte abhängige Aktivierung und *in vivo* eine im Gegensatz zu *Cetuximab*-basierten CAR schwächere Effektorfunktion gegenüber EGFR-positiven Zellen mit niedriger Expressionsdichte. Dagegen wurde die Aktivierung von CAR-T-Zellen mit hochaffinem *Cetuximab*-basierten CAR nicht durch die Dichte des EGFR beeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass sobald die Affinität zwischen CAR und Zielantigen ausreichend hoch ist, eine weitere Steigerung der Affinität nicht zu verstärkter CAR-Aktivität führt (Chmielewski et al. 2004, Jayaraman, Melody et al. 2020). Nimmt man diesen Hinweis als Grundlage, so könnte die Verwendung von CAR mit einer höher affinen Bindedomäne als der des vom mAb 4b12 abgeleiteten scFv auch mIgE_L niedrig exprimierende IgE-sezernierende Zellen noch effektiv eliminieren.

Die Testung anderer in der Literatur bekannter EMPD-spezifischer scFv hinsichtlich ihrer Affinität stellt folglich eine zielführende Herangehensweise dar, um effektivere CAR-Effektorzellen gegenüber Zielzellen mit niedriger EMPD-Expression zu entwickeln. Der humanisierte mAb 2E3E10 ist spezifisch gegen die EMPD gerichtet (Patent Nr. US 20180022826A1). Die Funktionalität des von 2E3E10 abgeleiteten scFv als Bindedomäne eines CAR auf primären T-Zellen konnte bereits in *in vitro*-Zytotoxizitätsassays nachgewiesen werden. Etwa 50 % der EMPD-positiven U266-Zielzellen wurden dabei von CAR^{2E3E10}-T-Zellen bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 abgetötet. Die Verträglichkeit und Wirksamkeit des EMPD-spezifischen humanisierte mAb Quilizumab wurde in mehreren klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien an Patienten mit leichtem Asthma oder allergischer Rhinitis erfolgreich bewiesen, die Behandlung mit Quilizumab führte zu einer langanhaltenden Senkung der Serum-IgE-Spiegel über sechs Monate (Harris, Maciucă et al. 2016). Die Entwicklung von CAR-T-Zellen, die einen von Quilizumab abgeleiteten scFv als CAR-Bindedomäne tragen, könnte eine Möglichkeit darstellen um IgE-sezernierende Zellen noch effektiver zu eliminieren. Ein weiterer EMPD-spezifischer humanisierter mAb, dessen Sicherheit bereits in einer klinischen Phase-I-Studie nachgewiesen wurde und der zurzeit in einer Phase-II-Studie an Patienten mit atopischer Dermatitis geprüft wird, ist FB825 (NCT02309762) (NCT03758716). Andere EMPD-spezifische mAb, beispielsweise 15c12 und mAbA9, befinden sich noch in präklinischer Prüfung. Bei beiden konnte gezeigt werden, dass sie die Apoptose von EMPD-exprimierende Zielzellen *in vitro* und

in vivo vermitteln und so die Serum-IgE-Spiegel signifikant gesenkt werden konnten (Feichtner, Infuhr et al. 2008, Vigl et al. 2017).

Neben einem scFv als Bindedomäne des CAR soll zukünftig ein zurzeit in der Entwicklung befindlicher Nanobody als Bindedomäne getestet werden. Nanobodies, auch V_HH-Fragmente, bestehen einzig aus der V_HH-Domäne eines *Heavy-Chain*-Antikörpers. Gegenüber scFv weisen Nanobodies eine geringere Molekülmasse und eine flexible, fingerähnliche Struktur der Antigen-Bindedomäne auf. Diese ermöglicht die spezifische Bindung von strukturbedingt schwer zu erreichenden Epitopen von Zielantigenen, die von scFv-Fragmenten eventuell nicht erreicht werden können (Wesolowski et al. 2009, Bannas, Hambach et al. 2017). Mit einem EMPD-spezifischen Nanobody, der möglicherweise eine bessere Erreichbarkeit der membrannahen EMPD erlauben würde, kann die zytotoxische Aktivität des Nanobody-tragenden CAR gegenüber EMPD-positiven Zellen vermutlich gesteigert werden. Die in der von Hambach *et al.* (Hambach, Riecken et al. 2020) untersuchten CD38-spezifischen Nanobody-basierten CAR-NK-92^{CD38^{-/-}}-Zellen erreichten eine spezifische Lyse von CD38-exprimierenden Zelllinien und primären Myelomzellen bei vergleichsweise niedrigen E:Z-Verhältnissen von 1:1 bezogen auf die Gesamtzellzahl der Knochenmarksprobe. Nanobody-basierte CAR, die einen oder auch zwei Nanobodies durch einen kurzen Linker verbunden in ihrer Bindedomäne trugen, wiesen in anderen Arbeiten (De Munter et al. 2018, Hambach, Riecken et al. 2020) eine ähnlich hohe *In-vitro*-Zytotoxizität wie scFv-basierte CAR auf. Darüber hinaus zeigte eine kürzlich durchgeführte klinische Studie mit CAR-T-Zellen, die einen Nanobody-basierten dual-spezifischen CAR exprimierten, der gleichzeitig gegen zwei verschiedene Epitope des *B cell maturation antigen* gerichtet war, eine Gesamtansprechrate von 88,2 % bei Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplem Myelom (Zhao et al. 2018, Xu et al. 2019). Diese potentiellen Vorteile sprechen dafür, die *In-vitro*-Zytotoxizität von CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen, die statt der hier verwendeten scFv einen EMPD-spezifischen Nanobody enthalten, gegenüber den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Ziel- und Kontrollzellen zu testen.

5.3.2 Einfluss der Spacerlänge auf die CAR-vermittelte zytotoxische Aktivität

Neben Auswirkungen der Antigenbindedomäne auf die Spezifität und zytotoxische Aktivität der CAR-Effektorzellen wurde auch der Einfluss des Spacers im CAR

untersucht. Der Spacer verbindet die extrazelluläre Bindedomäne mit der Transmembran- und damit auch der intrazellulären Domäne. Dies verleiht dem CAR dadurch räumliche Flexibilität in der Antigenbindung und beeinflusst somit die Erreichbarkeit des Zielepitops für die CAR-Bindedomäne. Gleichzeitig beeinflusst die Länge des Spacers auch die Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen Ziel- und Effektorzelle (James et al. 2008, Hudecek et al. 2015). Die hier experimentell geprüfte Hypothese besagte, dass Variationen in der Spacerlänge der EMPD-spezifischen CAR die Erreichbarkeit der EMPD beeinflussen und zu Unterschieden in der Bindung führen. IgE ist ein vergleichsweise großes und in seiner Konformation ausladendes Molekül, sodass angenommen wurde, dass das membran nahe Zielepitop in der EMPD für CAR mit kurzem Spacer schwieriger zugänglich sein könnte als für CAR mit langem Spacer. Hudecek *et al.* (Hudecek, Sommermeyer et al. 2015) hatten gezeigt, dass membrandistale Epitope eher kürzere Spacer benötigten, während längere Spacer bei membranproximalen Epitopen eine höhere Effektivität aufwiesen. Sowohl die EMPD als auch das Epitop der Zielstruktur des 4b12-scFvs liegen nach der vorausgesagten mIgE_L-Struktur nahe an der Transmembrandomäne (Chen, Wu et al. 2010). Daher wurden EMPD-spezifische CAR mit einem kurzen CD28- und einem langen IgG4-abgeleiteten Spacer vergleichend getestet. Hierbei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der zytotoxischen Aktivität gegenüber antigenträgenden Zielzellen (Abb. 28), sodass davon auszugehen ist, dass durch den CAR beider Spacerlängen eine ausreichende Erreichbarkeit und Bindung der EMPD gegeben ist.

5.4 Neuartige Therapie allergischer Erkrankungen mit CAR-Immunkzellen

Die hier evaluierte Funktionalität und Spezifität von EMPD- und damit mIgE_L-spezifischen CAR-Effektorzellen ist ein wichtiger Schritt zur Entwicklung einer adoptiven Immuntherapie für schwere allergische Erkrankungen. Die nachgewiesene Wirksamkeit von *Omalizumab*, einem IgE-spezifischen monoklonalen Antikörper, der zurzeit in der Behandlung von schwerem allergischem Asthma eingesetzt wird, bekräftigt den auf die Reduktion der IgE-Level gerichteten therapeutischen Ansatz, dem auch das hier vorgestellte Therapiekonzept zugrunde liegt. Da *Omalizumab* jedoch eine relativ kurze Halbwertszeit von ein bis vier Wochen besitzt, besteht die Notwendigkeit einer regelmäßigen subkutanen Verabreichung des Arzneimittels (Liour, Tom et al.

2016). Im Vergleich zu *Omalizumab* könnte mithilfe des therapeutischen Ansatzes mit CAR-T-Zellen eine dauerhafte Senkung des Serum-IgE-Spiegels und eine langfristige Symptomkontrolle gelingen. Das Erreichen dieses Ziels hängt dabei entscheidend von der Funktionalität und Persistenz der CAR-T-Zellen im Patienten ab. Die Langzeitpersistenz von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei Patienten mit malignen B-Zell-Erkrankungen deutet daraufhin, dass auch EMPD-spezifische autologe CAR-T-Zellen längere Persistenz *in vivo* zeigen könnten (Kalos et al. 2011). Es wird angenommen, dass ein Persistenz-unterstützender Mechanismus von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen die wiederholte Antigen-Stimulation durch CD19-positive B-Zellen ist (Yang et al. 2017). Die Proliferation und Persistenz von EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen, die mIgE_L-tragende B-Zellen erkennen, sollte von einer gleichartigen wiederholten Stimulation durch neu gebildete, nach Isotypwechsel mIgE_L-positive B-Zellen verstärkt werden. Das entzündliche Milieu der Schleimhäute und des Bronchialsystems nach Allergenkontakt begünstigt die Infiltration von T-Zellen und sollte demzufolge auch CAR-T-Zellen einschließen, sodass letztere mit hoher Wahrscheinlichkeit auch dort auf die mIgE_L-exprimierenden Zielzellen treffen könnten, stimuliert würden und persistieren könnten (KleinJan et al. 2000).

In einem neuen therapeutischen Ansatz zielten Ward *et al.* (Ward, Fay et al. 2018) darauf ab, IgE-produzierende B-Zellen mit CAR-T-Zellen zu eliminieren, deren CAR-Bindedomäne aus dem hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI gebildet wurde. Diese CAR-T-Zellen erkannten spezifisch IgE-exprimierende Zellen, nicht jedoch Mastzellen oder basophile Granulozyten, die lösliches IgE über eigene FcεRI-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche gebunden hatten. Ein Problem dieses Ansatzes bestand jedoch darin, dass bei hohen Serum-IgE-Spiegeln das lösliche IgE die Bindedomänen der CAR-T-Zellen besetzte und so die Bindung von mIgE-positiven B-Zellen hemmte. Erst durch Einsatz einer niedrigaffinen Variante des FcεRI als CAR-Bindedomäne konnte dieses Hindernis umgangen werden. Dieses Beispiel unterstreicht, wie akkurat bekannte Zielantigene auch bei nicht-malignen, entzündlichen Erkrankungen durch CAR-T-Zellen angegriffen und dass mIgE-tragende B-Zellen und Plasmazellen spezifisch eliminiert werden können und ist ein wichtiger Ansatz, der im Bereich der wissenschaftlichen Forschung kompetitiv bearbeitet wird. Aufgrund der hohen Anzahl erkrankter Patienten, könnte das CAR-T-Zell-Konzept insbesondere im Bereich der Allergien sehr interessant sein. Aufgrund der hier vorgeschlagenen Verwendung der

EMPD als Zielstruktur sIgE-sezernierender und mIgE_L-exprimierender Zellen wird das Problem einer Besetzung der CAR-Bindedomänen durch sIgE bei hohen Serumspiegeln umgangen.

Die adoptive Immuntherapie mit CAR-T-Zellen zur Behandlung allergischer Erkrankungen erfordert jedoch ein umfassendes Verständnis und eine ausreichende Kontrolle der Risiken, um eine nebenwirkungsarme Verwendung der genetisch modifizierten Zellen garantieren zu können. Die seit mehreren Jahren erprobte und für maligne B-Zell-Erkrankungen bereits zugelassene CAR-T-Zelltherapie gibt Aufschluss über Sicherheit und effektive Behandlung von Nebenwirkungen. Zu den unerwünschten Wirkungen zählen *On-target-off-tumor*-Effekte, das Zytokinfreisetzungssyndrom und ausgeprägte Neurotoxizität. Die Mehrheit der für eine CAR-Therapie ausgewählten Zielantigene auf malignen Zellen wird aufgrund eines Überlebensvorteils durch die Antigenexpression überexprimiert, jedoch exprimieren gesunde Zellen auch gewisse Mengen dieses Antigens. Aufgrund von weitreichenden Nebenwirkungen durch *On-target-off-tumor*-Effekte, die aus der Zielantigenexpression auf gesunden Zellen resultiert, wirft die CAR-T-Zelltherapie Bedenken auf (Jayaraman, Mellody et al. 2020). Im Rahmen einer CAR-T-Zelltherapie nicht-maligner Erkrankungen, wie der Typ-I-Allergie, die in der vorliegenden Arbeit evaluiert wurde, wurde dagegen ein Zielantigen gewählt, das ausschließlich von den zu eliminierenden Zellen exprimiert wird, so dass eine unerwünschte Toxizität durch *On-target-off-tumor*-analoge Effekte ausbleiben sollte. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass in Bezug auf die Therapie mit EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen die Zielzellen, EMPD-positive B-Zellen und Plasmazellen, keine intrinsischen Resistenz- oder *Escape*-Mechanismen gegenüber körpereigenen T-Zellen entwickeln. Die Eliminierung dieser Zellen sollte demnach effektiv und ohne Resistenzen gegenüber EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen erfolgen, so ist zum Beispiel auch ein immunsuppressives Mikromilieu nicht zu erwarten. Der vollständige oder teilweise Verlust der Zielantigenexpression der Zielzellen wird als *antigen escape* bezeichnet. Bei 7-25 % der mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen behandelten Patienten wurde ein Rezidiv mit CD19-negativen Tumorzellen beobachtet. Zu den Mechanismen des CD19-Verlusts auf der Zelloberfläche gehören Mutationen und Spleißvarianten des CD19-Gens (Majzner und Mackall 2018). Ähnlich zu diesen Beobachtungen wäre bei unserem Ansatz ein Verlust der Expression des mIgE auf B-Zellen und Plasmazellen im Rahmen der EMPD-spezifischen CAR-Zelltherapie nicht

denkbar. mIgE ist Teil des IgE-BCR-Komplexes und führt durch aktivierende Stimulation zu einem Überlebenssignal der IgE-BCR-tragenden Zelle. Ein vollständiger Verlust des IgE-BCR würde zum Funktionsverlust und letztendlich der Apoptose der Zelle führen, da sie von der regelhaften Aktivierung durch den BCR abhängig sind (Vanshylla, Opazo et al. 2018). Eine Deletion des mIgE_L-Gens im Mausmodell verursachte einen fast vollständigen Verlust an Serum-IgE *in vivo* (Achatz, Nitschke et al. 1997). Dagegen könnte der Verlust der Expression des IgE-BCR-Komplexes auf langlebigen, nicht-proliferierenden Plasmazellen zu einer anhaltenden IgE-Produktion nach Therapie mit EMPD-spezifischen CAR-Immunezellen führen. Zudem wird angenommen, dass die fortbestehende Produktion von IgE auch von IgG1-B-Gedächtniszellen ausgeht, die erst nach Reaktivierung den Isotypwechsel zu IgE durchführen und zunächst der gegen IgE gerichteten CAR-Immuntherapie entgehen (He et al. 2017, Wade-Vallance und Allen 2021). Aufgrund der kurzen Persistenz von CAR-NK-92-Zellen nach Applikation könnte eine langfristig erfolgreiche Therapie jedoch wahrscheinlich nur mit autologen T-Zellen als CAR-Effektorzellen erreicht werden. CAR-T-Zellen haben die potenzielle Fähigkeit über mehrere Jahre zu persistieren und einen konstanten Pool antigenspezifischer, reaktiver T-Zellen zu schaffen, die in der Lage sind, das Auftreten reaktiver IgE-produzierender B-Zellen zu kontrollieren (Porter et al. 2015, Maude, Laetsch et al. 2018, Tang, Yang et al. 2018).

Andere häufige Nebenwirkungen der CAR-T-Zelltherapie maligner B-Zell-Erkrankungen sind das Tumorlyse- oder Zytokinfreisetzungssyndrom. Dem Zytokinfreisetzungssyndrom liegt eine überschießende Immunantwort aufgrund der verstärkten CAR-T-Zellaktivierung nach Interaktion mit antigentragenden Zellen zugrunde. Die Folge ist eine gesteigerte Freisetzung von Interferon- γ und TNF- α durch die CAR-T-Zellen sowie eine verstärkte Aktivierung von Makrophagen und Monozyten (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2018). Das Auftreten dieser überschießenden Reaktion ist eher unwahrscheinlich bei einer CAR-T-Zelltherapie von schweren Allergien, da mIgE_L-positive B-Zellen nur einen sehr kleinen Teil der gesamten B-Zellpopulation ausmachen. Sollten mIgE_L-positive B-Zellen nachgebildet werden, so würde die damit einhergehende weitere Stimulation der EMPD-spezifischen CAR-T-Zellen deren Wirksamkeit aufrecht erhalten. Sollte die Nachbildung mIgE_L-positiver B- und Plasmazellen ausbleiben, wäre ein lange andauernder Therapieerfolg erreicht.

In Analogie zur der CAR-T-Zelltherapie maligner Erkrankungen wurden CAR-T-Zellen

bereits auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen entwickelt. Sogenannte *chimeric autoantibody receptor* (CAAR)-T-Zellen wurden dabei spezifisch gegen Autoantikörper-bildende B-Zellen gerichtet, um die Bildung der Autoantikörper zu hemmen. Die autoimmunen B-Zellen exprimieren den spezifischen Autoantikörper ebenfalls als BCR-Komplex an ihrer Oberfläche, sodass CAAR-T-Zellen, deren antigenbindende Domäne aus dem Autoantigen selbst besteht, gegen die krankheitsauslösenden autoimmunen B-Zellen gerichtet werden. Wenn eine CAAR-T-Zelle auf den BCR einer autoimmunen B-Zelle trifft, wird diese abgetötet und die Autoantikörperbildung wird unterdrückt. Der präklinische *proof-of-principle* wurde durch Ellebrecht *et al.* (Ellebrecht et al. 2016) anhand eines humanisierten Mausmodells von *Pemphigus vulgaris* erbracht. CAAR-T-Zellen, die Desmoglein 3 in ihrer Bindedomäne enthielten, induzierten hierbei eine spezifische Lyse der pathogenen B-Zellen. Somit stellen CAAR-T-Zellen eine innovative therapeutische Strategie dar, um die Autoantikörper-Bildung durch autoimmune B-Zellen und damit den ursächlichen Mechanismus der Erkrankung zu hemmen.

Neben den zellbasierten CAR-Immuntherapien verfolgt ein weiterer Ansatz die Verwendung von bispezifischen Antikörpern. *Bispecific T-cell Engagers* (BiTEs) und *Bispecific Killer cell Engagers* (BiKEs) sind rekombinante Proteine und bestehen aus zwei scFv-Fragmenten, die über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind, und so gleichzeitig zwei verschiedene Antigene binden können. BiTEs bedingen über einerseits Bindung an das Oberflächenprotein CD3 auf T-Zellen und andererseits Bindung eines gewählten Antigens auf Zielzellen eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort. Gleichermaßen vermitteln und induzieren BiKEs über die Bindung von CD16 auf NK-Zellen die Bildung von Immunsynapsen und NK-Zell-vermittelter ADCC. BiKEs und BiTEs wurden ursprünglich zur Behandlung von malignen hämatologischen B-Zell-Erkrankungen entwickelt. Der Anti-CD19-Anti-CD3-BiTE, *Blinatumomab*, zeigte hervorragende klinische Ergebnisse und ist in der Therapie der rezidivierender oder refraktären ALL zugelassen (Kantarjian et al. 2017). In präklinischen Studien wurden BiKEs entwickelt, die gegen eine Reihe verschiedener Tumorantigene gerichtet sind, darunter CD19, CD20 und CD33 für hämatologische Erkrankungen und *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2), *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) für solide Tumoren (Felices et al. 2016, Liu et al. 2021). BiTEs bzw. BiKEs können im Gegensatz zu autologen

CAR-T-Zellen in großer Menge *off-the-shelf* hergestellt werden, was eine schnell verfügbare und wiederholte Anwendung sowie eine Dosistitration und -eskalation ermöglicht. Des Weiteren hat beispielsweise *Blinatumomab* nur eine *In vivo*-Halbwertszeit von 2 bis 4 Stunden und erfordert eine kontinuierliche intravenöse Infusion. Der Vorteil dieses Ansatzes bietet ein höheres Sicherheitsprofil, da die Infusion jederzeit bei übermäßiger Immunaktivierung und immunbedingten unerwünschten Wirkungen wie dem Zytokinfreisetzungssyndrom und Neurotoxizität gestoppt werden kann (Subklewe 2021). Aufgrund der bereits etablierten klinischen Anwendung des IgE-neutralisierenden Antikörpers *Omalizumab* in der Therapie von allergischen Erkrankungen könnten neben CAR-Immunzellen ebenso BiTEs bzw. BiKEs eine aussichtsreiche Behandlungsstrategie darstellen, die gegen IgE-exprimierende Zellen gerichtet sind.

In Zusammenschau mit den präklinischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestehen genügend erfolgsversprechende Anzeichen dafür, dass sich das Prinzip der CAR-T- und CAR-NK-Zelltherapie maligner Erkrankungen auch insbesondere auf entzündliche, Antikörper-vermittelte Erkrankungen wie der Typ I-Allergie anwenden lässt.

5.5 Ausblick

Das Targeting und die Abtötung von mIgE_L-tragenden B-Zellen mittels EMPD-spezifischer CAR-Effektorzellen könnte ein erfolgreicher therapeutischer Ansatz für Patienten mit schwerwiegenden allergischen Erkrankungen sein. Die CAR-Immuntherapie wäre die Weiterentwicklung der bisherigen IgE-gerichteten Therapie mit dem Vorteil, die IgE-Produktion durch Abtötung IgE-produzierender B-Zellen in ihrem Ursprung zu hemmen und so die hohen Serum-IgE-Spiegel und die einhergehende Symptomatik mittel- bis langfristig zu unterdrücken. Aufgrund der erfolgreichen klinischen Anwendung von IgE-neutralisierenden Antikörpern wie *Omalizumab* in der Behandlung von allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale kann eine ebenso effektive oder sogar effektivere Behandlungsstrategie mit CAR-T-Zellen abgeleitet werden, die gegen IgE-exprimierende Zellen gerichtet sind. Mit dem hier dargestellten Forschungsvorhaben wurde die erste Grundlage für die präklinische und klinische Prüfung eines entsprechenden Therapiekonzepts geschaffen. Im Rahmen dieser Experimente erfolgte die Herstellung EMPD-spezifischer CAR-Effektorzellen und die *In-vitro*-Testung ihrer Spezifität und Fähigkeit IgE-

produzierende humane B-Zellen abzutöten. Damit erfolgte der erste präklinische Schritt in der Entwicklung eines neuen Therapieansatzes für schwere Typ-I-Allergien. In weiteren präklinischen Experimenten kann das hier entwickelte Konzept der CAR-T-Zelltherapie für Allergien in Hinblick auf ihre klinische Anwendbarkeit geprüft werden, indem die zytotoxische Aktivität von EMPD-spezifischen CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen gegenüber aus dem Blut oder Knochenmark von schweren Allergikern gewonnenen primären mIgE_L-tragenden B-Zellen und Plasmazellen getestet werden. Ein geeignetes Protokoll zur Identifizierung und Isolierung der mIgE_L-positiven B-Zellen und Plasmazellen anhand der B-Zell-spezifischen Marker CD19 und CD38 bzw. des Plasmazell-spezifischen Markers CD138 muss dafür etabliert werden. Zusätzlich steht ein IgE-spezifischer Antikörper und der in dieser Arbeit erstmals angewendete EMPD-spezifische Antikörper 4b12.V_L-V_H.rbFc (Abb. 12, Abb. 14) auch als Fluorochrom-konjugierter Antikörper für durchflusszytometrische Färbungen zur Verfügung. mIgE-positive B-Zellen und Plasmazellen machen nur einen sehr geringen Anteil der im Blut oder Knochenmark befindlichen B-Zellen und Plasmazellen aus. Eckl-Dorna *et al.* (Eckl-Dorna et al. 2019) konnten bei Gesunden 0,053 % mIgE-positive B-Zellen als Subpopulation der CD19-positiven B-Zellen im peripheren Blut nachweisen, während bei Birkenpollen-Allergikern mit hohem Serum-IgE-Level in der Hochsaison des Pollenflugs 0,23 % mIgE-positive B-Zellen identifiziert werden konnten. Die Charakterisierung von IgE-produzierenden B-Zellen und Plasmazellen und die *Ex-vivo*-Testung von CAR-T-Zellen, die gegen diese Zellen gerichtet sind, stellt aus diesem Grund bislang eine Herausforderung dar. Mögliche Ansätze zur Anreicherung eines erhöhten Anteils primärer IgE-positiver B-Zellen aus peripherem Blut wären zum Einen die Selektion dieser Zellen beispielsweise mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Zum Anderen könnte durch *in vitro*-Stimulation von primären B-Zellen ein Isotypwechsel ihres BCR von IgM zu IgE induziert werden. Auch die Messung von löslichem IgE im Zellkulturüberstand als Marker für IgE-produzierende B-Zellen könnte sich als zielführende Methode erweisen.

Ein Großteil des derzeitigen Verständnisses der Mechanismen, die der IgE-Produktion zugrunde liegen, basiert auf Daten, die im Mausmodell gewonnen wurden (Wu und Zarrin 2014). Ein weiterer Schritt der präklinischen Experimente wäre eine *In-vivo*-Testung der CAR-T-Zellen in einem Mausmodell mit transgenen Mäusen, die die humane EMPD-Sequenz in ihrem mIgE_L-Gen tragen (Brightbill, Jeet et al. 2010).

Skuljec et al. (Skuljec et al. 2017) nutzten ein etabliertes Mausmodell für Ovalbumin-induzierte allergische Atemwegsentzündungen, die im Rahmen von allergischem Asthma auftreten, um die Effektivität von CAR-tragenden regulatorischen T (T_{reg})-Zellen, die gegen das Lungenepithel gerichtet waren, *in vivo* zu testen. CAR- T_{reg} -Zellen unterdrückten hier die pathophysiologischen Merkmale einer allergischen Atemwegsentzündung und führten zu einer signifikanten Reduktion des Ovalbumin-spezifischen löslichen sIgE im Serum. In einem ähnlichen Mausmodell könnte die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene *In-vitro*-Effektivität der EMPD-spezifischen CAR-Effektorzellen gegenüber mIgE_L-tragenden B-Zellen *in vivo* evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Das Projekt „Allergie-Reset“ hat die Entwicklung der Instrumente, Ziel- und Kontrollzellen eines neuen Therapieansatzes für schwere Typ-I-Allergien zum Ziel, bei dem die sIgE-produzierenden B- und Plasmazellen im Körper von Allergikern mit Hilfe autologer CAR-T-Zellen oder allogener CAR-NK-92-Zellen selektiv eliminiert werden. Damit soll die fortgesetzte Bildung löslicher sIgE unterbunden und die Allergiesymptomatik reduziert oder sogar aufgehoben werden. Membranständige mIgE sind auf der Oberfläche sIgE-produzierender Plasmazellen, Plasmablasten und Memory B-Zellen zu finden. Nur die mIgE_L auf diesen Zellen enthalten als Zielstruktur eine „*Extracellular Membrane Proximal Domain*“ (EMPD), die ein Zielepitop enthält, welches von dem humanen Antikörper 4b12 spezifisch erkannt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche retrovirale CAR-Vektoren konstruiert, die einen CAR der dritten Generation mit einem scFv des humanen Antikörpers 4b12 als antigenspezifische Bindedomäne in einer der zwei Konfigurationen 4b12.V_H-V_L bzw. 4b12.V_L-V_H sowie zwischen Bindedomäne und Transmembrandomäne verschieden lange von CD28 bzw. IgG4 abgeleitete Spacerdomänen enthalten. Nach Herstellung entsprechender Vektorpartikel wurden mit diesen Vektoren primäre humane T-Zellen und NK-92-Zellen transduziert. Die erfolgreiche Expression der Vektoren wurde durch Messung des Fluoreszenzmarkers nachgewiesen. Zur Prüfung von Spezifität und Funktionalität der CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen wurden Ziel- und Kontroll-B-Zellen hergestellt: (1) Ramos-B-Zellen mit mIgE_L inklusive EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemL}) und (2) Ramos-B-Zellen mit mIgE_S ohne EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemS}). Die EMPD-spezifischen CAR-T- und CAR-NK-92-Zellen wurden sodann hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber den EMPD-positiven Zielzellen nach Etablierung geeigneter Bedingungen in *In-vitro*-Zytotoxizitätsassays getestet. Die Ergebnisse zeigten die erwartete Spezifität und Aktivierung der Lyseaktivität der EMPD-spezifischen CAR^{4b12.V_H-V_L}- und CAR^{4b12.V_L-V_H}-Effektorzellen gegenüber den EMPD-positiven Ramos^{luc/GFP-hemL}-Zellen, während die EMPD-negativen Ramos^{luc/GFP-hemS}-Zellen erwartungsgemäß nicht lysiert wurden. Mit diesem *proof-of-principle* wurde die Hypothese bestätigt, dass EMPD-spezifische CAR-Effektorzellen hergestellt und EMPD-positive, mIgE_L-tragende Zielzellen damit *in vitro* selektiv abgetötet werden können.

Summary

In type I allergic diseases, allergen-specific immunoglobulin E (IgE)-expressing B cells secrete soluble IgE (sIgE), whose effector function mediates allergic symptoms. This preclinical project aimed to take first steps for the development of a new therapy for IgE-mediated allergies by administering autologous chimeric antigen receptor (CAR)-T cells or allogeneic CAR-NK-92 cells able to selectively eliminate sIgE-producing B and plasma cells in allergic patients. This should reduce or prevent the secretion of sIgE *in vivo* and thus reduce symptoms. Membrane-bound IgE (mIgE) is present on most, if not all, sIgE-producing plasma cells, plasma blasts and memory B cells. Only the long isoform mIgE_L contains an extracellular membrane proximal domain (EMPD), which serves as the target epitope specifically recognized by the monoclonal antibody 4b12. Hence, different retroviral vectors were constructed encoding a third-generation CAR with a scFv derived from 4b12 as the antigen-specific binding domain in two different configurations, 4b12.V_H-V_L and 4b12.V_L-V_H. A short and a long spacer peptide linking the binding domain and the transmembrane domain of each CAR was derived from CD28 and IgG4, respectively. The vectors were used to transduce primary human T cells and the permanent cell line NK-92. Successful expression of either of the vectors was demonstrated by measuring fluorescent markers also encoded by the CAR vectors. To test the specificity and functionality of the resulting CAR-T and CAR-NK-92 cells, well defined target and control cells were generated: (1) Ramos B cells expressing mIgE_L including the EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemL}) and (2) Ramos B cells expressing mIgEs without the EMPD (Ramos^{luc/GFP-hemS}). In *in vitro* cytotoxicity assays the cytotoxic activities of the EMPD-specific CAR-T and CAR-NK-92 cells towards EMPD-positive target cells were analyzed. The EMPD-specific CAR^{4b12.V_H-V_L} and CAR^{4b12.V_L-V_H} effector cells were shown to be functional *in vitro* as they efficiently mediated antigen-specific lysis of EMPD-positive Ramos^{luc/GFP-hemL} cells, but not of EMPD-negative Ramos^{luc/GFP-hemS} cells. The results provided the proof-of-principle for the functionality of the novel EMPD-specific CAR effector cells generated in this study by showing that EMPD-positive, mIgE_L-expressing target cells can be selectively killed *in vitro* by EMPD-targeting CAR-T but also CAR-NK-92 cells. In summary, EMPD-specific CAR-T and CAR-NK-92 cells could be a new and promising therapeutic approach to the treatment of severe IgE-mediated allergic diseases.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| ADCC | <i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i> |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| B-ALL | akute lymphatische B-Zell-Leukämie |
| BCR | B-Zell-Antigenrezeptor |
| BiKEs | <i>Bispecific T-cell Engagers</i> |
| BiTEs | <i>Bispecific Killer cell Engagers</i> |
| BFP | <i>blue fluorescent protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BSD | Blasticidin-S-Deaminase |
| CAAR | chimärer Autoantikörperrezeptor |
| CAR | chimärer Antigenrezeptor |
| Cas | <i>CRISPR-associated</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CDR | <i>complementarity determining region</i> |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> |
| DLBCL | diffus großzelliges B-Zell-Lymphom |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> |
| E:Z-Verhältnis | Effektor- zu Zielzell-Verhältnis |
| EFS | Promotor des humanen Elongationsfaktor 1 α (<i>short Version</i>) |
| eGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> |
| EMPD | extrazelluläre Membran-proximale Domäne |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting/scanning</i> |
| Fc | <i>fragment crystallisable</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| g | Gramm |
| GALV | <i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i> |
| Gly | Glycin |
| GvHD | <i>Graft-versus-Host-Reaktion</i> |
| h | Stunden |
| hemL | <i>human Ig epsilon heavy chain, long isoform</i> |
| hemS | <i>human Ig epsilon heavy chain, short isoform</i> |
| IE | Internationale Einheit |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IRES | interne ribosomale Eintrittsstelle |
| ITAM | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| l | Liter |
| LTR | <i>Long Terminal Repeat</i> |
| m | Milli |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| mIgE | membranständiges Immunglobulin E |
| mIgE _L | lange Isoform der schweren Kette des membranständigen IgE |
| mIgE _S | kurze Isoform der schweren Kette des membranständigen IgE |
| min | Minuten |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | Primer-Bindungsstelle |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PMBCL | primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom |
| PRE | posttranskriptionelles regulatorisches Element |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| rbFc | Fc-Region eines IgG von Kaninchen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RRE | HIV-1 Rev- <i>responsive</i> Element |
| RSV | <i>Rous Sarcoma Virus</i> |
| s | Sekunden |
| SA | <i>Splice Akzeptor</i> |
| scFv | <i>single-chain variable fragment</i> |
| SD | <i>Splice Donor</i> |
| SDS-PAGE | <i>sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Ser | Serin |
| SFFV | <i>Spleen Focus-Forming Virus</i> |
| sIgE | lösliches Immunglobulin E |
| SIN | <i>self inactivating</i> |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| T _H -Zellen | T-Helferzellen |
| TM | Transmembrandomäne |
| TU | <i>transducing units</i> |
| U | <i>Unit</i> |
| V _H | variable Domäne der schweren Kette |
| V _H H | variable Domäne eines <i>Heavy-Chain</i> -Antikörpers |
| V _L | variable Domäne der leichten Kette |
| wPRE | posttranskriptionelles regulatorisches Element, abgeleitet vom Murmeltier-Hepatitisvirus |
| μ | Mikro |

8 Literaturverzeichnis

- "Fachinformation Kymriah®, Novartis. Stand März 2020."
- "Fachinformation Yescarta®, Kite, Gilead. Stand Januar 2020."
- "Fachinformation Xolair®, Novartis. Stand Juli 2020"
- "Pressemitteilung Gilead, U.S. FDA Approves Kite's Tecartus, the First and Only CAR T Treatment for Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma, Juli 2020."
- Achatz, G., L. Nitschke and M. C. Lamers (1997). "Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response." *Science* 276(5311): 409-411.
- Badbaran, A., C. Berger and K. Riecken (2020). "Accurate In-Vivo Quantification of CD19 CAR-T Cells after Treatment with Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) and Tisagenlecleucel (Tisa-Cel) Using Digital PCR." 12(7).
- Bannas, P., J. Hambach and F. Koch-Nolte (2017). "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics." *Front Immunol*.
- Bellou, A., G. Kanny, S. Fremont and D. A. Moneret-Vautrin (1997). "Transfer of atopy following bone marrow transplantation." *Ann Allergy Asthma Immunol* 78(5): 513-516.
- Benhamou, A. H., S. A. Zamora and P. A. Eigenmann (2008). "Correlation between specific immunoglobulin E levels and the severity of reactions in egg allergic patients." *Pediatr Allergy Immunol* 19(2): 173-179.
- Bergmann, K. C., J. Heinrich and H. Niemann (2016). "Current status of allergy prevalence in Germany: Position paper of the Environmental Medicine Commission of the Robert Koch Institute." *Allergo J Int* 25: 6-10.
- Brightbill, H. D., S. Jeet, Z. Lin, D. Yan, M. Zhou, M. Tan, A. Nguyen, S. Yeh, D. Delarosa, S. R. Leong, T. Wong, Y. Chen, M. Ultsch, E. Luis, S. R. Ramani, J. Jackman, L. Gonzalez, M. S. Dennis, A. Chuntharapai, L. DeForge, Y. G. Meng, M. Xu, C. Eigenbrot, W. P. Lee, C. J. Refino, M. Balazs and L. C. Wu (2010). "Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice." *J Clin Invest* 120(6): 2218-2229.
- Buhl, R., M. Solèr, J. Matz, R. Townley, J. O'Brien, O. Noga, K. Champain, H. Fox, J. Thirlwell and G. Della Cioppa (2002). "Omalizumab provides long-term control in patients with moderate-to-severe allergic asthma." *Eur Respir J* 20(1): 73-78.
- Burger, M. C., C. Zhang, P. N. Harter, A. Romanski, F. Strassheimer, C. Senft, T. Tonn, J. P. Steinbach and W. S. Wels (2019). "CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy." *Front Immunol* 10: 2683.
- Cambier, J. C., S. B. Gauld, K. T. Merrell and B. J. Vilen (2007). "B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?" *Nat Rev Immunol* 7(8): 633-643.
- Caruso, H. G., L. V. Hurton, A. Najjar, D. Rushworth, S. Ang, S. Olivares, J. Cooper (2015). "Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity." *Cancer Res* 75(17): 3505-3518.

- Celik-Bilgili, S., A. Mehl, A. Verstege, U. Staden, M. Nocon, K. Beyer and B. Niggemann (2005). "The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges." *Clin Exp Allergy* 35(3): 268-273.
- Chang, T. W. (2000). "The pharmacological basis of anti-IgE therapy." *Nat Biotechnol* 18(2): 157-162.
- Chang, T. W., P. C. Wu, C. L. Hsu and A. F. Hung (2007). "Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases." *Adv Immunol* 93: 63-119.
- Chang, X., X. Zang and C. Q. Xia (2016). "New strategies of DLI in the management of relapse of hematological malignancies after allogeneic hematopoietic SCT." *Bone Marrow Transplant* 51(3): 324-332.
- Chen, H. Y., F. T. Liu, C. M. Hou, J. S. Huang, B. B. Sharma and T. W. Chang (2002). "Monoclonal antibodies against the C(epsilon)mX domain of human membrane-bound IgE and their potential use for targeting IgE-expressing B cells." *Int Arch Allergy Immunol* 128(4): 315-324.
- Chen, J. B., P. C. Wu, A. F. Hung, C. Y. Chu, T. F. Tsai, H. M. Yu, H. Y. Chang and T. W. Chang (2010). "Unique epitopes on C epsilon mX in IgE-B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells." *J Immunol* 184(4): 1748-1756.
- Chmielewski, M., A. Hombach, C. Heuser, G. P. Adams and H. Abken (2004). "T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity." *J Immunol* 173(12): 7647-7653.
- Chowdhury, P. S., Y. Chen, C. Yang, K. E. Cook, A. C. Nyborg, R. Ettinger, R. Herbst, P. A. Kiener and H. Wu (2012). "Targeting the junction of CεmX and ε-miG1b for the specific depletion of mIgE-expressing B cells." *Mol Immunol* 52(3-4): 279-288.
- Cichutek, S. (2019). Konstruktion und Funktionalitätstest lentiviraler und gammaretroviraler Vektoren zur Expression Nanobody-basierender chimärer Antigenrezeptoren (CAR) gegen CD38 Diplomarbeit.
- Coombs, R. a. P. G. (1968). "Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease." *Clinical Aspects of Immunology*: p. 575-596.
- Davis, F. M., L. A. Gossett and T. W. Chang (1991). "An epitope on membrane-bound but not secreted IgE: implications in isotype-specific regulation." *Biotechnology (N Y)* 9(1): 53-56.
- De Munter, S., J. Ingels, G. Goetgeluk and S. Bonte (2018). "Nanobody Based Dual Specific CARs." 19(2).
- Desplancq, D., D. J. King, A. D. Lawson and A. Mountain (1994). "Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3." *Protein Eng* 7(8): 1027-1033.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono and L. Naldini (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol* 72(11): 8463-8471.

- Eckl-Dorna, J. and V. Niederberger (2013). "What is the source of serum allergen-specific IgE?" *Curr Allergy Asthma Rep* 13(3): 281-287.
- Eckl-Dorna, J., S. Villazala-Merino, N. J. Campion, M. Byazrova, A. Filatov, D. Kudlay, A. Karsonova, K. Riabova, M. Khaitov and A. Karaulov (2019). "Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients." 8(9).
- Eden, T., S. Menzel, J. Wesolowski, P. Bergmann, M. Nissen, G. Dubberke, F. Seyfried, B. Albrecht, F. Haag and F. Koch-Nolte (2017). "A cDNA Immunization Strategy to Generate Nanobodies against Membrane Proteins in Native Conformation." *Front Immunol* 8: 1989.
- Ellebrecht, C. T., V. G. Bhoj, A. Nace, E. J. Choi, X. Mao, M. J. Cho, G. Di Zenzo, A. Lanzavecchia, J. T. Seykora, G. Cotsarelis, M. C. Milone and A. S. Payne (2016). "Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease." *Science* 353(6295): 179-184.
- Engels, N. and J. Wienands (2018). "Memory control by the B cell antigen receptor." 283(1): 150-160.
- Feichtner, S., D. Infuhr, G. Achatz-Straussberger, D. Schmid, A. Karnowski, M. Lamers, C. Rhyner, R. Cramer and G. Achatz (2008). "Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo." *J Immunol* 180(8): 5499-5505.
- Felices, M., T. R. Lenvik, Z. B. Davis, J. S. Miller and D. A. Vallera (2016). "Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells." *Methods Mol Biol* 1441: 333-346.
- Funaro, A., G. C. Spagnoli, C. M. Ausiello, M. Alessio, S. Roggero, D. Delia, M. Zaccolo and F. Malavasi (1990). "Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation." *J Immunol* 145(8): 2390-2396.
- Gauvreau, G. M., J. M. Harris, L. P. Boulet, H. Scheerens, J. M. Fitzgerald, W. S. Putnam, L. C. Wu, J. G. Matthews and P. M. O'Byrne (2014). "Targeting membrane-expressed IgE B cell receptor with an antibody to the M1 prime epitope reduces IgE production." *Sci Transl Med* 6(243): 243ra285.
- Gross, G., T. Waks and Z. Eshhar (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.
- Hallstrand, T. S., J. D. Sprenger, J. M. Agosti, G. M. Longton, R. P. Witherspoon and W. R. Henderson, Jr. (2004). "Long-term acquisition of allergen-specific IgE and asthma following allogeneic bone marrow transplantation from allergic donors." *Blood* 104(10): 3086-3090.
- Hambach, J. (2018). Herstellung und Charakterisierung von CD38-spezifischen Nanobody-basierten Chimeren Antigen Rezeptoren. Master of Science, Masterarbeit, Universität Hamburg.
- Hambach, J., K. Riecken, S. Cichutek, K. Schutze, B. Albrecht, K. Petry, J. L. Rockendorf, N. Baum, N. Kroger, T. Hansen, G. Schuch, F. Haag, G. Adam, B. Fehse, P. Bannas and F. Koch-Nolte (2020). "Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs)." *Cells* 9(2).

- Harris, J. M., R. Maciuca, M. S. Bradley, C. R. Cabanski, H. Scheerens, J. Lim, F. Cai, M. Kishnani, X. C. Liao, D. Samineni, R. Zhu, C. Cochran, W. Soong, J. D. Diaz, P. Perin, M. Tsukayama, D. Dimov, I. Agache and S. G. Kelsen (2016). "A randomized trial of the efficacy and safety of quilizumab in adults with inadequately controlled allergic asthma." *Respir Res* 17: 29.
- He, J. S., M. Meyer-Hermann, D. Xiangying, L. Y. Zuan, L. A. Jones, L. Ramakrishna, V. C. de Vries, J. Dolpady, H. Aina, S. Joseph, S. Narayanan, S. Subramaniam, M. Puthia, G. Wong, H. Xiong, M. Poidinger, J. F. Urban, J. J. Lafaille and M. A. Curotto de Lafaille (2013). "The distinctive germinal center phase of IgE⁺ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response." *J Exp Med* 210(12): 2755-2771.
- He, J. S., S. Subramaniam, V. Narang, K. Srinivasan, S. P. Saunders, D. Carbajo, T. Wen-Shan, N. Hidayah Hamadee, J. Lum, A. Lee and J. Chen (2017). "IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses." *J Exp Med* 213(1): 641.
- Holgate, S. T., A. G. Chuchalin, J. Hébert, J. Lötvall, G. B. Persson, K. F. Chung, J. Bousquet, H. A. Kerstjens, H. Fox, J. Thirlwell and G. D. Cioppa (2004). "Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma." *Clin Exp Allergy* 34(4): 632-638.
- Holgate, S. T., R. Djukanović, T. Casale and J. Bousquet (2005). "Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy." *Clin Exp Allergy* 35(4): 408-416.
- Hu, Y., Z. G. Tian and C. Zhang (2018). "Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy." *Acta Pharmacol Sin* 39(2): 167-176.
- Hudecek, M., D. Sommermeyer, P. L. Kosasih, A. Silva-Benedict, L. Liu, C. Rader, M. C. Jensen and S. R. Riddell (2015). "The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity." *Cancer Immunol Res* 3(2): 125-135.
- Humbert, M., R. Beasley, J. Ayres, R. Slavin, J. Hébert, J. Bousquet, K. M. Beeh, S. Ramos, G. W. Canonica, S. Hedgecock, H. Fox, M. Blogg and K. Surrey (2005). "Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE." *Allergy* 60(3): 309-316.
- James, S. E., P. D. Greenberg, M. C. Jensen, Y. Lin, J. Wang, B. G. Till, A. A. Raubitschek, S. J. Forman and O. W. Press (2008). "Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane." *J Immunol* 180(10): 6833-6841.
- Jayaraman, J., M. P. Mellody, A. J. Hou, R. P. Desai, A. W. Fung, A. H. T. Pham, Y. Y. Chen and W. Zhao (2020). "CAR-T design: Elements and their synergistic function." *EBioMedicine* 58: 102931.
- June, C. H., R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi and M. C. Milone (2018). "CAR T cell immunotherapy for human cancer." *Science* 359(6382): 1361-1365.

- Kalos, M., B. L. Levine, D. L. Porter, S. Katz, S. A. Grupp, A. Bagg and C. H. June (2011). "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." *Sci Transl Med* 3(95): 95ra73.
- Kantarjian, H., A. Stein, N. Gökbuget, A. K. Fielding, A. C. Schuh, J. M. Ribera, A. Wei, H. Dombret, R. Foà, R. Bassan, Ö. Arslan, M. A. Sanz, J. Bergeron, F. Brüggemann, W. Klapper, B. L. Wood, A. Fleishman, D. Nagorsen, C. Holland, Z. Zimmerman and M. S. Topp (2017). "Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia." *N Engl J Med* 376(9): 836-847.
- Klein, G., B. Giovanella, A. Westman, J. S. Stehlin and D. Mumford (1975). "An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection." *Intervirology* 5(6): 319-334.
- KleinJan, A., J. G. Vinke, L. W. Severijnen and W. J. Fokkens (2000). "Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients." *Eur Respir J* 15(3): 491-497.
- Krokhotin, A., H. Du, K. Hirabayashi, K. Popov, T. Kurokawa, X. Wan, S. Ferrone, G. Dotti and N. V. Dokholyan (2019). "Computationally Guided Design of Single-Chain Variable Fragment Improves Specificity of Chimeric Antigen Receptors." *Mol Ther Oncolytics* 15: 30-37.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2017). "The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis." *Nat Immunol* 18(10): 1076-1083.
- Liour, S. S., A. Tom, Y. H. Chan and T. W. Chang (2016). "Treating IgE-mediated diseases via targeting IgE-expressing B cells using an anti-Cepsilon mAb antibody." *Pediatr Allergy Immunol* 27(5): 446-451.
- Liu, S., V. Galat, Y. Galat, Y. K. A. Lee, D. Wainwright and J. Wu (2021). "NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development." *J Hematol Oncol* 14(1): 7.
- Locke, F. L., A. Ghobadi, C. A. Jacobson, D. B. Miklos, L. J. Lekakis, O. O. Oluwole, Y. Lin, I. Braunschweig, B. T. Hill, J. M. Timmerman, A. Deol, P. M. Reagan, Jiang, A. Bot, J. M. Rossi, J. J. Kim, W. Y. Go and S. S. Neelapu (2019). "Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial." *Lancet Oncol* 20(1): 31-42.
- Luo, D., N. Mah, M. Krantz, K. Wilde, D. Wishart, Y. Zhang, F. Jacobs and L. Martin (1995). "Vl-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions." *J Biochem* 118(4): 825-831.
- Majzner, R. G. and C. L. Mackall (2018). "Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy." *Blood* 132(10): 1219-1226.
- Majzner, R. G., S. P. Rietberg, L. Labanieh, E. Sotillo, E. W. Weber, R. Lynn, J. Theruvath, C. Yuan, P. Xu, S. Nguyen, N. Shah, M. Stetler-Stevenson, T. Fry, D. Lee and C. Mackall (2018). "Low CD19 Antigen Density Diminishes Efficacy of CD19 CAR T Cells and Can be Overcome By Rational Redesign of CAR Signaling Domains." *Blood* 132: 963-963.

- Malavasi, F., S. Deaglio, A. Funaro, E. Ferrero, A. L. Horenstein, E. Ortolan, T. Vaisitti and S. Aydin (2008). "Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology." *Physiol Rev* 88(3): 841-886.
- Martkamchan, S., N. Onlamoon, S. Wang, K. Pattanapanyasat and P. Ammaranond (2016). "The Effects of Anti-CD3/CD28 Coated Beads and IL-2 on Expanded T Cell for Immunotherapy." *Adv Clin Exp Med* 25(5): 821-828.
- Maude, S. L., T. W. Laetsch, J. Buechner, S. Rives, M. Boyer, H. Bittencourt, P. Bader, M. R. Verneris, H. E. Stefanski, G. D. Myers, M. Qayed, B. De Moerloose, H. Hiramatsu, K. Schlis, K. L. Davis, P. L. Martin, E. R. Nemecek, G. A. Yanik, C. Peters, A. Baruchel, N. Boissel, F. Mechinaud, A. Balduzzi, J. Krueger, C. H. June, B. L. Levine, P. Wood, T. Taran, M. Leung, K. T. Mueller, Y. Zhang, K. Sen, D. Lebwohl, M. A. Pulsipher and S. A. Grupp (2018). "Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia." *N Engl J Med* 378(5): 439-448.
- Mock, U., R. Thiele, A. Uhde, B. Fehse and S. Horn (2012). "Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells." *Hum Gene Ther Methods* 23(6): 408-415.
- Murphy K., W. C. (2018). *Allergien und allergische Erkrankungen*. Janeway Immunologie, Springer Spektrum. 9. Auflage: 783-834.
- Nilsson, K., H. Bennich, S. G. Johansson and J. Ponten (1970). "Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient." *Clin Exp Immunol* 7(4): 477-489.
- Park, J. H., I. Rivière, M. Gonen, X. Wang, B. Sénéchal, K. J. Curran, C. Sauter, Y. Wang, B. Santomasso, E. Mead, M. Roshal, P. Maslak, M. Davila, R. J. Brentjens and M. Sadelain (2018). "Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia." *N Engl J Med* 378(5): 449-459.
- Peng, C., F. M. Davis, L. K. Sun, R. S. Liou, Y. W. Kim and T. W. Chang (1992). "A new isoform of human membrane-bound IgE." *J Immunol* 148(1): 129-136.
- Porter, D. L., W. T. Hwang, N. V. Frey, S. F. Lacey, P. A. Shaw, A. W. Loren, A. Bagg, K. T. Marcucci, A. Shen, V. Gonzalez, D. Ambrose, S. A. Grupp, A. Chew, Z. Zheng, M. C. Milone, B. L. Levine, J. J. Melenhorst and C. H. June (2015). "Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia." *Sci Transl Med* 7(303): 303ra139.
- Qasim, W., H. Zhan, S. Samarasinghe, S. Adams, P. Amrolia, S. Stafford, K. Butler, C. Rivat, G. Wright, K. Somana, S. Ghorashian, D. Pinner, G. Ahsan, K. Gilmour, G. Lucchini, S. Inglott, W. Mifsud, R. Chiesa, K. S. Peggs, L. Chan, F. Farzeneh, A. J. Thrasher, A. Vora, M. Pule and P. Veys (2017). "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells." *Sci Transl Med* 9(374).
- Rafiq, S. and C. S. Hackett (2020). "Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy." *17(3): 147-167.*
- Rajagopal, V., I. Pastan and R. J. Kreitman (1997). "A form of anti-Tac(Fv) which is both single-chain and disulfide stabilized: comparison with its single-chain and disulfide-stabilized homologs." *Protein Eng* 10(12): 1453-1459.

- Ramadani, F., H. Bowen, N. Upton, P. S. Hobson, Y. C. Chan, J. B. Chen, T. W. Chang, J. M. McDonnell, B. J. Sutton, D. J. Fear and H. J. Gould (2017). "Ontogeny of human IgE-expressing B cells and plasma cells." *Allergy* 72(1): 66-76.
- Riecken, K. (; 2007). "Transfection of 293T cells." 20-11-2018, from <http://www.LentiGO-Vectors.de>.
- Rolinck-Werninghaus, C., T. Keil, M. Kopp, S. Zielen, U. Schauer, A. von Berg, U. Wahn and E. Hamelmann (2008). "Specific IgE serum concentration is associated with symptom severity in children with seasonal allergic rhinitis." *Allergy* 63(10): 1339-1344.
- Sadelain, M., I. Rivière and S. Riddell (2017). "Therapeutic T cell engineering." *Nature* 545(7655): 423-431.
- Saunders, S. P., E. G. M. Ma, C. J. Aranda and M. A. Curotto de Lafaille (2019). "Non-classical B Cell Memory of Allergic IgE Responses." *Front Immunol* 10: 715.
- Schambach, A., D. Mueller, M. Galla, M. M. Versteegen, G. Wagemaker, R. Loew, C. Baum and J. Bohne (2006). "Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors." *Gene Ther* 13(21): 1524-1533.
- Schmitt, M. E. R., J. Lutz, P. Haase, M. R. Bösl, J. Wienands, N. Engels and D. Voehringer (2020). "The B-cell antigen receptor of IgE-switched plasma cells regulates memory IgE responses." *J Allergy Clin Immunol* 146(3): 642-651.e645.
- Shifrin, N., D. H. Raulet and M. Ardolino (2014). "NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition." *Semin Immunol* 26(2): 138-144.
- Shimabukuro-Vornhagen, A., P. Gödel, M. Subklewe, H. J. Stemmler, H. A. Schlößer, M. Schlaak, M. Kochanek, B. Böll and M. S. von Bergwelt-Baildon (2018). "Cytokine release syndrome." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6(1): 56.
- Skuljec, J., M. Chmielewski, C. Happle, A. Habener, M. Busse, H. Abken and G. Hansen (2017). "Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma." *Front Immunol* 8: 1125.
- Smith, K. G., T. D. Hewitson, G. J. Nossal and D. M. Tarlinton (1996). "The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci." *Eur J Immunol* 26(2): 444-448.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." *Annu Rev Immunol* 27: 591-619.
- Subklewe, M. (2021). "BiTEs better than CAR T cells." *Blood Adv* 5(2).
- Suck, G., M. Odendahl, P. Nowakowska, C. Seidl, W. S. Wels, H. G. Klingemann and T. Tonn (2016). "NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* 65(4): 485-492.

- Tang, X., L. Yang, Z. Li, A. P. Nalin, H. Dai, T. Xu, J. Yin, F. You, M. Zhu, W. Shen, G. Chen, X. Zhu, D. Wu and J. Yu (2018). "First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia." *Am J Cancer Res* 8(6): 1083-1089.
- Valenta, R. (2002). "The future of antigen-specific immunotherapy of allergy." *Nat Rev Immunol* 2(6): 446-453.
- Vanshylla, K., F. Opazo, K. Gronke, J. Wienands and N. Engels (2018). "The extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE restricts B cell activation by limiting B cell antigen receptor surface expression." *Eur J Immunol* 48(3): 441-453.
- Vigl, B., N. Salhat, M. Parth, H. Pankevych, A. Mairhofer, S. Bartl and O. W. Smrzka (2017). "Quantitative in vitro and in vivo models to assess human IgE B cell receptor crosslinking by IgE and EMPD IgE targeting antibodies." *J Immunol Methods* 449: 28-36.
- Wade-Vallance, A. K. and C. D. C. Allen (2021). "Intrinsic and extrinsic regulation of IgE B cell responses." *Curr Opin Immunol* 72: 221-229.
- Wang, J.-Y. (2020). *B Cells in Immunity and Tolerance. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer.
- Wang, M., J. Munoz, A. Goy, F. L. Locke, C. A. Jacobson, B. T. Hill, J. M. Timmerman, H. Holmes, S. Jaglowski, I. W. Flinn, P. A. McSweeney, D. B. Miklos, J. M. Pagel, M. J. Kersten, N. Milpied, H. Fung and M. S. Topp (2020). "KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma." *382(14): 1331-1342.*
- Wang, W., J. Jiang and C. Wu (2020). "CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects." *Cancer Lett* 472: 175-180.
- Ward, D. E., B. L. Fay, A. Adejuwon, H. Han and Z. Ma (2018). "Chimeric Antigen Receptors Based on Low Affinity Mutants of FcepsilonRI Re-direct T Cell Specificity to Cells Expressing Membrane IgE." *Front Immunol* 9: 2231.
- Weber, K., U. Mock, B. Petrowitz, U. Bartsch and B. Fehse (2010). "Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis." *Gene Ther* 17(4): 511-520.
- Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauherff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V. Serreze, F. A. Goldbaum, F. Haag and F. Koch-Nolte (2009). "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity." *Med Microbiol Immunol* 198(3): 157-174.
- Wu, L. C. and H. Scheerens (2014). "Targeting IgE production in mice and humans." *Curr Opin Immunol* 31: 8-15.
- Wu, L. C. and A. A. Zarrin (2014). "The production and regulation of IgE by the immune system." *Nat Rev Immunol* 14(4): 247-259.
- Xiong, H., J. Dolpady, M. Wabl, M. A. Curotto de Lafaille and J. J. Lafaille (2012). "Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies." *J Exp Med* 209(2): 353-364.

- Xu, J., L. J. Chen, S. S. Yang, Y. Sun, W. Wu, Y. F. Liu, J. Xu, Y. Zhuang, W. Zhang, X. Q. Weng, J. Wu, Y. Wang, J. Wang, H. Yan, W. B. Xu, H. Jiang, J. Du, X. Y. Ding, B. Li, J. M. Li, W. J. Fu, J. Zhu, L. Zhu, Z. Chen, X. F. Fan, J. Hou, J. Y. Li, J. Q. Mi and S. J. Chen (2019). "Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(19): 9543-9551.
- Yang, Y., M. Kohler and T. Fry (2017). "Effect of Chronic Endogenous Antigen Stimulation on CAR T Cell Persistence and Memory Formation." *Blood: Supplement 1*.
- Zhang, C., P. Oberoi, S. Oelsner, A. Waldmann, A. Lindner, T. Tonn and W. S. Wels (2017). "Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity." *Front Immunol* 8: 533.
- Zhang, K., A. Saxon and E. E. Max (1992). "Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons." *J Exp Med* 176(1): 233-243.
- Zhao, W. H., J. Liu, B. Y. Wang, Y. X. Chen, X. M. Cao, Y. Yang, Y. L. Zhang, F. X. Wang, P. Y. Zhang, B. Lei, L. F. Gu, J. L. Wang, N. Yang, R. Zhang, H. Zhang, Y. Shen, J. Bai, Y. Xu, X. G. Wang, R. L. Zhang, L. L. Wei, Z. F. Li, Z. Z. Li, Y. Geng, Q. He, Q. C. Zhuang, X. H. Fan, A. L. He and W. G. Zhang (2018). "A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma." *J Hematol Oncol* 11(1): 141.

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, PD Dr. Kristoffer Riecken für die Realisierung der Promotionsarbeit sowie der sehr guten Betreuung während des gesamten Promotionsprozesses. Darüber hinaus war er mir stets auch ein freundschaftlicher Wegbereiter und Mentor. Ich danke auch Prof. Dr. Boris Fehse für die Möglichkeit, das Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die wertvollen wissenschaftlichen Anmerkungen sowie für seine Unterstützung auf meinem beruflichen Weg. Weiter bedanke ich mich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit. Ein großer Dank gilt auch Dr. Thomas Eden, Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Alessa Schaffrath und Natalie Tode des Instituts für Immunologie für die enge Kooperation an diesem gemeinsamen Projekt.

Ich danke zudem dem iPRIME Promotionskolleg der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die Förderungen dieses Projektes.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Zweitgutachter für die Bereitschaft die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Vielen Dank für eure ungebrochene Zuversicht, euer unerreichtes Engagement und den starken Rückhalt. Euch widme ich diese Arbeit.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum, Unterschrift