

**Glykan-bindende Domänen als chimäre
Antigenrezeptoren in der zellulären Immuntherapie
pädiatrischer Leukämien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Charlotte Wessolowski

aus

Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Ingo Müller

Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Jasmin Wellbrock

Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Jasmin Wellbrock

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Rutkowski

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Walter Fiedler

Datum der mündlichen Prüfung: 19.09.2025

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Leukämien im Kindesalter	1
1.2	CAR-Immuntherapien	1
1.3	Veränderungen in der Oberflächenglykosylierung bei Tumorerkrankungen	7
1.4	Lektine	10
1.5	Lektin-basierte CARs	15
1.6	Ziel dieser Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Geräte	19
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.4	Puffer	22
2.1.5	Reaktions-Kits	22
2.1.6	Antikörper, Glykokonjugate, rekombinante Proteine und Isotypen	22
2.1.7	Zellkultur	25
2.1.8	Enzyme und Enzympuffer	26
2.1.9	Primer	26
2.1.10	Vektoren, Plasmide und cDNA	27
2.1.11	Softwareprogramme	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	28
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.2.1.4	Restriktionsverdau	33
2.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.1.6	Transformation von Bakterien	33
2.2.1.7	Plasmidisolation	34
2.2.1.8	Sequenzierung	34
2.2.2	Zellkultur und zellbiologische Methoden	35
2.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien	35
2.2.2.2	Isolation und Kultivierung von primären Zellen	37
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.2.2.4	Ermittlung der Zellzahl	39
2.2.2.5	Retrovirusproduktion	39
2.2.2.6	Virale Transduktion	40
2.2.2.7	Zellsortierung	40
2.2.2.8	Durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen	40
2.2.3	Immunologische Methoden/Funktionalitäts-Tests	44
2.2.3.1	Zytotoxizitäts-Test (Calcein-basiert)	44
2.2.3.2	MTT-Test	45

2.2.3.3	Degranulations-Test	45
2.2.3.4	Enzymgekoppelter Immunadsorptions-Test (IFN γ)	46
2.2.4	Statistische Analyse	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Untersuchung der Oberflächenglykosylierung mit rekombinanten humanen Lektinen	48
3.1.1	Vorarbeiten zur Oberflächenglykosylierung von Leukämiezelllinien	48
3.1.2	Verlust der Oberflächenglykosylierung von primären Leukämieproben im aufgetauten Zustand	49
3.1.3	Frische pädiatrische und adulte primäre Leukämieproben	50
3.1.4	Periphere Blutzellen und hämatopoetische Stammzellen gesunder Spender	52
3.2	Klonierung der LEC-CARs	57
3.3	Oberflächenlokalisation und Bindungseigenschaften der LEC-CARs	59
3.3.1	Oberflächennachweis mit den Antikörpern Anti-Myc und Anti-Siglec7	59
3.3.2	Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre Glykoliganden	61
3.4	Funktionelle Testung der LEC-CARs gegenüber Leukämiezellen	63
3.4.1	Zytotoxizität von LEC-CARs ohne Linker	63
3.4.2	Zytotoxizität von LEC-CARs mit Linker	64
3.4.3	Zytotoxizität des SRCL LEC-CARs mit und ohne Linker	66
3.4.4	Degranulation des SRCL LEC-CARs mit und ohne Linker	68
3.4.5	IFN γ -Freisetzung des SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker	70
3.5	Zytotoxische Aktivität des SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker gegenüber der Brustkrebszelllinie KPL-1	71
4	DISKUSSION	75
4.1	Vergleich der Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen mit Zellen des hämatopoetischen Systems gesunder Spender	75
4.2	Klonierung, Oberflächennachweis und Bindungseigenschaften der LEC-CARs	80
4.3	Möglichkeiten und Limitationen von Fusions-LEC-CARs	82
4.4	Der Siglec7 LEC-CAR zeigt keine zytotoxische Aktivität gegenüber Leukämiezellen	86
4.5	Der SRCL LEC-CAR ist gegenüber Leukämiezellen und der Brustkrebszelllinie KPL-1 zytotoxisch aktiv	88
4.6	Vorteile von LEC-CARs gegenüber konventionellen CARs	90
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
5.1	Deutsch	94
5.2	Englisch	95

6	LITERATURVERZEICHNIS	97
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
9	TABELLENVERZEICHNIS	110
10	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	111
11	ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS	112
12	DANKSAGUNG	113
13	ANHANG	115
13.1	Primer	115
13.2	Vektorkarten	117
13.3	Versuchsreplikate	123
14	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	130

1 Einleitung

1.1 Leukämien im Kindesalter

Leukämien sind maligne Neubildungen hämatopoetischer Zellen. Dabei kommt es zur unkontrollierten Vermehrung entarteter Zellen aus der myeloischen oder lymphatischen Reihe mit Verdrängung der normalen Hämatopoese. Leukämien werden in akute und chronische Verlaufsformen sowie, je nach betroffener Zellreihe, in myeloische und lymphatische Leukämien unterteilt.

Kinder und Jugendliche erkranken vorwiegend an akut verlaufenden Leukämien, chronische Formen sind sehr selten. Etwa 80% der akuten Leukämien im Kindesalter sind lymphatisch. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist mit 3,9 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner unter 18 Jahren und einem Anteil von etwa 22% die häufigste maligne Tumorerkrankung im Kindes- und Jugendalter. Der typische Altersgipfel liegt hierbei zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr (Erdmann et al. 2020). Die Therapie der ALL erfolgt risikoadaptiert mittels einer Kombinationschemotherapie und gegebenenfalls einer allogenen Stammzelltransplantation (Schaich 2020, Escherich und Schrappe 2021). Die Prognose einer ALL im Kindesalter ist gut, die Rate der Langzeitüberlebenden (mindestens 15 Jahre nach Diagnosestellung) liegt bei 90% (Erdmann et al. 2020).

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist mit 0,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner unter 18 Jahren seltener als die ALL und macht nur einen Anteil von circa 20% der akuten pädiatrischen Leukämien aus. Die altersspezifische Inzidenz im Kindes- und Jugendalter ist am höchsten in den ersten beiden Lebensjahren (Erdmann et al. 2020). Im Erwachsenenalter hingegen ist die akute myeloische Leukämie mit einem Anteil von 75-80% die häufigste Form der akuten Leukämien, die Inzidenz nimmt mit dem Alter deutlich zu (Erdmann et al. 2021, Schaich 2020). In der Therapie der pädiatrischen AML ist eine risikoadaptierte, intensive Polychemotherapie der Standard. Die Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) in erster Remission gilt nur für Patienten mit unzureichendem Therapieansprechen oder ungünstiger Zytogenetik. Bei einem Rezidiv ist die allogene HSZT für alle betroffenen Patienten indiziert (Schaich 2020, Creutzig et al. 2019). Die AML im Kindesalter hat eine schlechtere Prognose als die ALL, die Rate der Langzeitüberlebenden (mindestens 15 Jahre) liegt bei 74% (Erdmann et al. 2020).

1.2 CAR-Immuntherapien

Wachsende Erkenntnisse über die Mechanismen der Tumorentstehung und der damit verbundenen Rolle des Immunsystems haben die Entwicklung von Therapien möglich gemacht, die spezifisch die Wirkung des Immunsystems nutzen. Solche Immuntherapien

stellen in der Onkologie neben der operativen Therapie, Radiotherapie und Chemotherapie mittlerweile eine wichtige vierte Therapiesäule dar (Abken 2021, Lesch und Gill 2021). Immuntherapien lassen sich in monoklonale Antikörper (mAb), zelluläre Immuntherapien (Modulation von Immunzellen und adoptiver Zelltransfer), Tumorimpfstoffe und die onkolytische Virotherapie einteilen (Lesch und Gill 2021, Zhang und Zhang 2020).

Eine Unterform der zellulären Immuntherapien stellen Chimäre-Antigen-Rezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) dar – genetisch veränderte T-Zellen, die unabhängig von Humanen Leukozyten-Antigen-Merkmalen (HLA-Merkmalen) wirken. Chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs) sind synthetische Fusionsproteine und vereinen die Spezifität eines Antikörpers mit der zytotoxischen Effektivität einer T-Zelle (June und Sadelain 2018, Majzner und Mackall 2019). CARs der ersten Generation wurden in den 1990er Jahren entwickelt. Diese CARs beinhalten als extrazelluläre Antigen-bindende Domäne ein rekombinantes Antikörperfragment (*single-chain variable fragment*, scFv), welches aus den über einen kurzen Linker verbundenen leichten und schweren variablen Ketten eines Immunglobulins besteht und damit die Spezifität des CARs bestimmt. Zusätzlich verbunden mit dem scFV ist eine Domäne, meist die ζ -Kette von *Cluster of Differentiation* (CD) 3, zur Aktivierung der T-Zelle. Mit diesen CARs transduzierte T-Zellen zeigen zwar eine spezifische zytotoxische Aktivität nach Bindung der entsprechenden Antigene auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*, allerdings ist die T-Zell-Aktivierung nur kurzanhaltend und gering. Diese Problematik führte Anfang der 2000er Jahre zur Entwicklung von CARs der zweiten Generation, die eine zusätzliche costimulatorische Domäne integriert haben. Diese CARs bestehen aus dem extrazellulären scFv, welche über eine Linkerregion mit einer Transmembrandomäne zur Verankerung des CARs in der T-Zelle verbunden ist, und der intrazellulären Signalsequenz. Letztere beinhaltet die costimulatorische Domäne, meist CD28 oder 4-1BB, sowie CD3 ζ . Durch die Integration der costimulatorischen Domäne gelingt eine höhere Aktivierung der T-Zellen mit verstärkter Zytokinausschüttung, erhöhter Proliferationsrate und erhöhter Persistenz auch bei wiederholter Antigenbindung. So konnte die antitumorale Antwort der CAR-T-Zellen deutlich verbessert werden (June und Sadelain 2018, Abken 2021). In den nachfolgenden Jahren ist an zusätzlichen Erweiterungen von CARs geforscht worden. So beinhalten CARs der dritten Generation zwei kombinierte costimulatorische Domänen (z.B. CD28 und 4-1BB). CARs der vierten Generation ähneln dem Aufbau eines Zweitgenerations-CARs, sind aber zusätzlich mit der Fähigkeit ausgestattet, ein transgenes therapeutisches Protein, meist Interleukin-12, nach Antigenbindung spezifisch im Tumorgebiet zu produzieren. Durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wird u.a. das angeborene Immunsystem aktiviert und so die antitumorale Wirkung der CAR-T-Zelltherapie untermauert und potentiell gesteigert (Elahi et al. 2018, Abken 2021). Trotz dieser Weiterentwicklungen spielen CARs der zweiten Generation weiterhin eine große

Rolle und konnten bei hämatologischen Erkrankungen bereits große Durchbrüche erzielen, sodass hierzu die größte klinische Erfahrung vorliegt. 2017 wurde das erste CAR-T-Zellprodukt von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen: das gegen CD19-gerichtete CAR-T-Zellprodukt Tisagenlecleucel zur Behandlung der pädiatrischen B-ALL (seit 2018 auch zur Behandlung des adulten diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms). Ebenfalls seit 2017 zur Behandlung des adulten diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms zugelassen ist das anti-CD19-CAR-T-Zellprodukt Axicabtagen-Ciloleucel (Ahmad et al. 2020). Weitere anti-CD19-CAR-T-Zellprodukte folgten 2020 (Brexucabtagen-Autoleucel) und 2021 (Lisocabtagen maraleucel) (Abken 2021). Auch in der Behandlung des multiplen Myeloms fand 2021 die CAR-T-Zelltherapie Einzug mit dem gegen *B-Cell-Maturation-Antigen* (BCMA) gerichteten Idecabtagene vicleucel (Manier et al. 2022, Choi und Kang 2022). All diese therapeutischen Produkte nutzen CARs der zweiten Generation. Es befinden sich viele CAR-T-Zelltherapien in präklinischer und klinischer Testung. Allerdings konnte der bisherige Erfolg von CAR-T-Zellen bei hämatologischen Erkrankungen trotz intensiver Forschung noch nicht gänzlich auf solide Tumorentitäten übertragen werden, sodass hier noch keine Zulassungen vorliegen. Gründe dafür sind u.a. die Antigenheterogenität bei soliden Tumorzellen, die Schwierigkeit für CAR-T-Zellen das Tumorgewebe über das vaskuläre Endothel hinweg zu infiltrieren sowie die lokal immunsuppressiv wirkende Tumormikroumgebung (Marofi et al. 2021).

Die praktische Durchführung einer CAR-T-Zelltherapie besteht aus einem mehrwöchigem aufwendigem Prozess und ist in Abbildung 1 dargestellt. Wenn ein Patient eine CAR-T-Zelltherapie erhalten soll, müssen zunächst die T-Zellen mittels Leukapharese aus dem Blut des Patienten gewonnen und isoliert werden. Nach Aktivierung der T-Zellen in bestimmten Zellkulturmedien (z.B. mit Interleukin-2 oder monoklonalen Antikörpern) erfolgt der Gentransfer des CAR-Konstrukts – am häufigsten verwendet wird dafür die lenti- oder retrovirale Transduktion. Die genetisch modifizierten T-Zellen exprimieren nun den CAR auf ihrer Oberfläche und werden anschließend bis zur benötigten Zellzahl über mehrere Tage expandiert. Nach der finalen Aufbereitung und Qualitätskontrolle des CAR-T-Zellprodukts wird dieses dem Patienten, der in der Zwischenzeit eine lymphodepletierende Chemotherapie zur Vorbereitung erhalten hat, infundiert (Vormittag et al. 2018). Die CAR-T-Zellen zirkulieren im Körper des Patienten, binden spezifisch die Tumorzellen und werden dadurch aktiviert, sodass sie proliferieren und die Tumorzellen töten können.

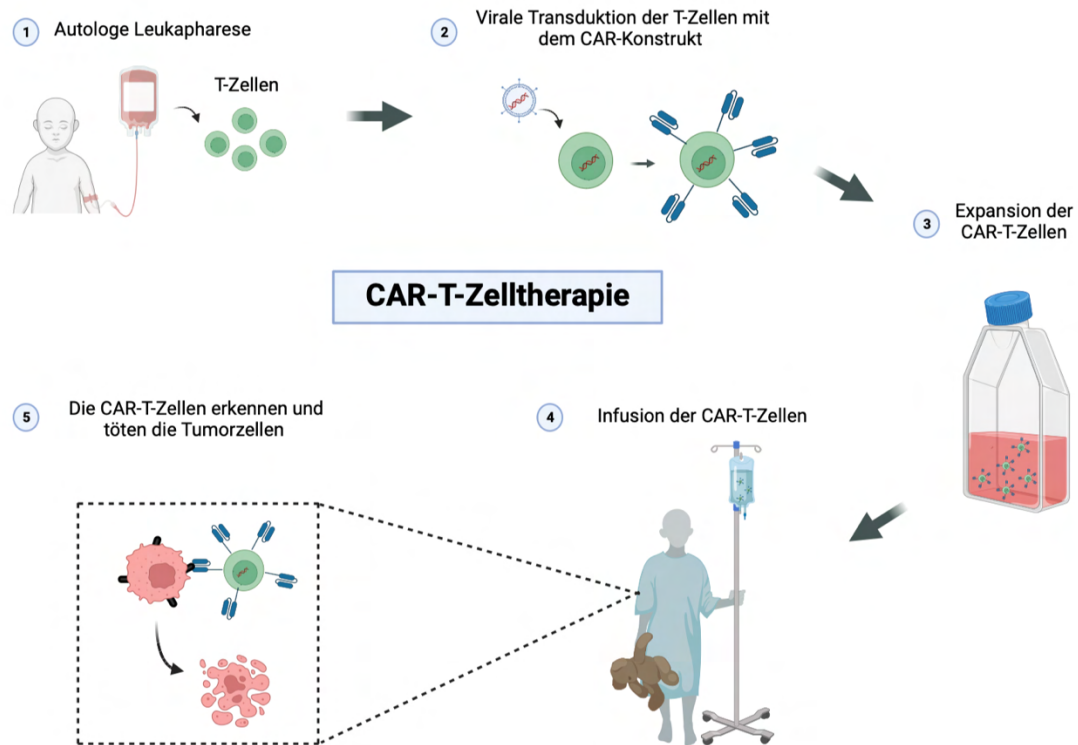


Abbildung 1 Durchführung einer CAR-T-Zelltherapie. Über autologe Leukaphrese werden T-Zellen des Patienten gewonnen und isoliert. Der Gentransfer des CAR-Konstrukts in die T-Zellen erfolgt über virale Transduktion, sodass die T-Zellen anschließend den CAR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach ausreichender Expansion und Aufbereitung der CAR-T-Zellen werden diese dem Patienten infundiert, wo sie nun die Tumorzellen spezifisch erkennen und töten können. Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt. CAR = Chimärer Antigenrezeptor

Dieser aufwendige Prozess der Herstellung von CAR-T-Zellen bringt einige Nachteile mit sich. Durch die lange Produktionsdauer kommt es zu einer Behandlungsverzögerung, was insbesondere für Patienten mit hoher Proliferationsrate ihrer Tumorerkrankung ein Problem darstellt (Lesch und Gill 2021). Des Weiteren geht die Produktion der CAR-T-Zellprodukte mit hohen Kosten einher, die Preise liegen im sechsstelligen Bereich (Vormittag et al. 2018). Abgesehen von diesen logistischen Problemen kann eine CAR-T-Zelltherapie mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einhergehen. Eine häufige Nebenwirkung ist das Zytokinfreisetzungssyndrom (*cytokine release syndrome*, CRS), das u.a. mit Fieber, Hypoxie, Hypotension und Organdysfunktion in teils lebensbedrohlichem Ausmaß einhergehen kann. Eine weitere Nebenwirkung von gegen CD19 und BCMA gerichteten CAR-T-Zellen ist die Neurotoxizität in Form von Enzephalopathie, Hirnödem und Krampfanfällen (June und Sadelain 2018, Brudno und Kochenderfer 2019). Diese unerwünschte Wirkungen korrelieren mit der Anzahl der infundierten CAR-T-Zellen, der vorbestehenden Tumorlast, der Art des CAR-Konstrukts und individuellen Patientenfaktoren (Lesch und Gill 2021). Je nach Antigenpezifität des CARs kommen spezifische Nebenwirkungen als sogenannte *on-target/off-tumor* Toxizität durch die Überschneidung der Antigenexpression von Tumorzellen und normalen Zellen dazu. Bei

CD19-CAR-T-Zellen kommt es so beispielsweise zur B-Zell-Aplasie und damit Hypogammaglobulinämie (Brudno und Kochenderfer 2019, Flugel et al. 2023).

Eine Möglichkeit, *on-target/off-tumor* Toxizität zu reduzieren, der Antigenheterogenität von Tumorzellen zu begegnen und die Wahrscheinlichkeit für ein *Immunescape* durch Verlust der Antigenexpression zu senken, besteht in der Fusion von zwei Antigen-bindenden Domänen in einem CAR-Konstrukt. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine davon ist der Tandem-CAR, in dem zwei scFv mit verschiedenen Antigenespezifitäten, über einen Linker fusioniert, mit nur einer intrazellulären Signaldomäne verbunden werden (Hartmann et al. 2017, Chen et al. 2018). Solch bispezifische Tandem-CARs, beispielsweise als CD20-CD19-CAR, werden bereits klinisch in der Behandlung von malignen B-Zellerkrankungen getestet (Shah et al. 2020, Tong et al. 2020). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die intrazellulären Signaldomänen in einem konditionalen CAR aufzuteilen. Hierbei werden die Costimulations-Domäne (z.B. CD28) und die T-Zellaktivierungs-Domäne (z.B. CD3 ζ) jeweils mit einer scFv verbunden, die verschiedene Antigene binden. Zu einer ausreichenden CAR-T-Zellaktivierung kommt es damit erst, wenn beide Antigene gleichzeitig gebunden werden (Hartmann et al. 2017, Abken 2021). Eine weitere Möglichkeit ist die Co-Expression zweier eigenständiger CARs mit verschiedenen Antigenespezifitäten in einer Multi-CAR-T-Zelle. Genauso möglich ist auch ein Pooling von T-Zellen, die jeweils nur einen Typ von CARs tragen, in einem CAR-T-Zellprodukt (Hartmann et al. 2017). Darüber hinaus haben Roybal et al. einen synthetischen Notch (SynNotch) Rezeptor (entwickelt von Morsut et al. 2016) mit einem CAR für ein duales Antigentargeting kombiniert. Der konstitutiv exprimierte SynNotch-Rezeptor enthält eine Bindungsdomäne (z.B. ein scFv) für ein erstes Antigen und induziert nach dessen Bindung über eine Signalkaskade die Expression des CARs mit Spezifität für ein zweites Tumorantigen. Erst nach Bindung des CARs an sein spezifisches Tumorantigen wird dann die T-Zell-Aktivierung und Zytotoxizität ausgelöst, sodass letztendlich beide Antigene in einer Art Schaltkreis dafür benötigt werden. Das ermöglicht eine Steuerung und genaue Wirkung am erwünschten Ort, erhöht die Spezifität und reduziert damit die *on-target/off-tumor* Toxizität (Roybal et al. 2016).

In der Therapie der pädiatrischen ALL und AML kommen Immuntherapien eine immer größere Bedeutung zu. Denn trotz verbesserter und risikoadaptierter Chemotherapie-Protokolle und der Möglichkeit einer HSZT ist die Leukämie bei einigen Kindern und Jugendlichen therapierefraktär oder rezidivierend. Die Rezidiv-Rate beträgt bei der pädiatrischen ALL etwa 15-20% (Gaudichon et al. 2019), bei der pädiatrischen AML circa 30% (Zwaan et al. 2015). Da die konventionellen Chemotherapien bei Dosissteigerungen mit einer erheblichen und teils nicht tolerierbaren Toxizität einhergehen, ist es wichtig,

zielgerichtete Therapieansätze für an rezidivierter oder therapierefraktärer (r/r) Leukämie erkrankten Patienten zu finden (Pui 2020, Creutzig et al. 2019). Bei der Behandlung der pädiatrischen AML werden zwar verschiedene immuntherapeutische Konzepte in Studien überprüft, bisher konnte allerdings kein Immuntherapeutikum zugelassen werden. Zu den untersuchten Substanzen gehört unter anderem Gemtuzumab Ozogamicin, ein Immunkonjugat bestehend aus einem CD33-Antikörper und dem Zytotoxin Chaliceamicin (Creutzig et al. 2019). Gemtuzumab Ozogamicin zeigte sich in Studien auf Basis eines *Compassionate Use* bei Kindern und Jugendlichen mit r/r AML effektiv als Therapie vor einer HSZT (Zwaan et al. 2010, Niktoreh et al. 2019). In der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie zur AML (Stand August 2023) besteht die Empfehlung für den Einsatz von Gemtuzumab Ozogamicin bei der rezidivierten AML von pädiatrischen Patienten als Zusatz zur Chemotherapie (Röllig et al. 2023).

Bei der Behandlung der pädiatrischen ALL hingegen sind bereits erste zielgerichtete immuntherapeutische Ansätze geprüft und zugelassen (Subklewe 2021, Pui 2020). Zu den bereits zugelassenen und klinisch eingesetzten Immuntherapeutika gehört unter anderem der monoklonale Antikörper Blinatumomab. Dieser Antikörper ist bispezifisch (*bispecific T-cell engager*, BiTE) und besteht aus zwei scFv, die über einen Linker miteinander verbunden sind und jeweils an CD3 auf der Oberfläche von T-Zellen und an CD19 auf der Oberfläche von B-Zellen binden (Löffler et al. 2003). Da CD19 auch auf den Blasten der B-Zellbasierten ALL (B-ALL) exprimiert wird (Raponi et al. 2011), führt Blinatumomab die CD3-positiven zytotoxischen T-Zellen mit den Leukämiezellen zusammen, sodass die patienteneigenen T-Zellen diese erkennen und eliminieren können (Löffler et al. 2003). Zugelassen von der FDA und der *European Medicines Agency* (EMA) ist Blinatumomab für die r/r B-ALL und für die B-ALL bei minimaler Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) (Kantarjian et al. 2017, Gökbüget et al. 2018, Subklewe 2021).

Des Weiteren stellt die Behandlung mit CAR-T-Zellen eine neuartige Behandlungsmöglichkeit der B-ALL dar. Seit 2017 ist das gegen CD19 gerichtete CAR-T-Zellprodukt Tisagenlecleucel zur Behandlung von Kindern und jungen Erwachsenen unter 26 Jahren mit r/r B-ALL nach zwei oder mehr systemischen Standardtherapien von der FDA zugelassen (June und Sadelain 2018, Subklewe 2021). In der Phase-2-Studie von Tisagenlecleucel (ELIANA), die zur Zulassung bei Patienten bis zu 25 Jahren mit B-ALL führte, betrug die Gesamtremissionsrate 81% (mindestens drei Monate *follow-up*), davon waren alle Patienten MRD-negativ. Unter diesen Patienten mit Therapieansprechen betrug die ereignisfreie Überlebensrate nach einem Jahr 59%. Die Gesamtüberlebensrate nach 12 Monaten unter allen infundierten Patienten betrug 76%. Die CAR-T-Zellen persistierten im Median 168 Tage im Blut der Patienten. Diese individualisierte und spezifische Therapiemöglichkeit ermöglicht damit eine effiziente und anhaltende Remission der B-ALL

von Patienten mit einer einzigen Tisagenlecleucel-Infusion (Maude et al. 2018, Ahmad et al. 2020). In einem 3-Jahres-Follow-up der ELIANA-Studie betrug die ereignisfreie Überlebensrate 44% (ereignisfreies Überleben im Median 24 Monate), die rezidivfreie Überlebensrate 52% (bzw. nicht zensiert für nachfolgende Therapien 48%) und die Gesamtüberlebensrate 63% nach 36 Monaten. Unter den Patienten mit kompletter Remission wurde das ereignisfreie Überleben im Median nicht erreicht. Des Weiteren traten keine neuen unerwünschten Ereignisse auf (Laetsch et al. 2023).

Für die Behandlung der AML befinden sich zwar verschiedene CAR-T-Zellen in klinischer Testung – bis heute gibt es allerdings noch keine für die AML zugelassene CAR-T-Zelltherapie. AML-Zellen zeigen eine hohe immunphänotypische und genetische Variabilität und anders als bei der CAR-T-Zelltherapie der ALL konnte bisher kein Marker gefunden werden, der fast ausschließlich auf die AML-Zellen beschränkt ist. Viele Zielantigene von AML-Blasten überschneiden sich mit der normalen Hämatopoese inklusive der Vorläuferzellen und Stammzellen. Daraus kann eine schwere Hämatotoxizität von CAR-Immuntherapien resultieren. Die verlängerte Myelosuppression oder sogar Myeloablation kann zu schweren, potentiell letalen Infektionen führen. Anders sieht es bei der CD19-CAR-T-Zelltherapie der B-ALL aus, bei der eine B-Zellaplasie beispielsweise supportiv mit Immunglobulingaben behandelt werden kann (Hofmann et al. 2019, Acharya und Walter 2020). Deshalb müssen für Erkrankungen wie die AML neue Zielantigenstrukturen zur Behandlung mit CAR-T-Zellen gefunden werden. Da CAR-T-Zellen ihre Wirkung HLA-unabhängig entfalten, sind neben Proteinstrukturen wie CD19 auch Nichtproteine wie z.B. Glykane als Zielstruktur potentiell geeignet. Diese neuen Angriffspunkte sollten möglichst selektiv nur auf den AML-Zellen vorhanden sein.

1.3 Veränderungen in der Oberflächenglykosylierung bei Tumorerkrankungen

Glykane stellen den Kohlenhydratanteil von Glykolipiden und Glykoproteinen dar und sind komplexe Heteropolymere, bestehend aus Monosacchariden wie z.B. Galactose (Gal), Fucose, Mannose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) oder Sialinsäuren (Köttgen et al. 2003). Die Familie der Sialinsäuren umfasst über 80 in der Literatur beschriebenen Mitglieder. Die am häufigsten natürlich vorkommende Sialinsäure ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), alle anderen Sialinsäuren stellen Derivate von Neu5Ac dar (Schauer und Kamerling 2018). Die bei anderen Säugetieren weit verbreitete Sialinsäure N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) kann aufgrund einer Mutation im Gen, welches das Enzym zur Konversion von Neu5Ac zu Neu5Gc kodiert, vom Menschen physiologischerweise nicht gebildet werden. Sialinsäuren sind fast ausschließlich terminal

an Oligosacchariden lokalisiert und werden dort von spezifischen Sialyltransferasen über α 2-3, α 2-6 oder α 2-8 Konfigurationen mit dem subterminalen Zucker verknüpft (Crocker et al. 2007).

Glykane, die an Glykoproteine gebunden sind, werden je nach Bindung zwischen Zucker und Protein in verschiedene Typen eingeteilt. Die beiden größten Gruppen stellen die O-Glykane (an Serin oder Threonin gebunden) und N-Glykane (an Asparagin gebunden) dar (Köttgen et al. 2003, Schjoldager et al. 2020).

Glykane haben wichtige vielfältige biologische Funktionen. Dazu gehören u.a. strukturelle Aufgaben wie die Beteiligung an der Organisation von Zellmembranen, Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Makromolekülen, Bildung von Muzinschichten mit Barrierefunktion und Energiespeicherung in Form von Glykogen. Glykane sind aber auch als Marker für Endozytose und Phagozytose, für intrazelluläre Signalwege und für Adhäsionsprozesse wichtig. Auch bei der Interaktion mit Pathogenen wie Bakterien, Pilzen und Parasiten spielen Glykane eine bedeutende Rolle (Varki 2017).

Im Rahmen der malignen Transformation von Zellen kommt es zum Auftreten bestimmter Markerglykane an der Zelloberfläche, sogenannter tumorassoziierter Kohlenhydratantigene (*Tumor-associated carbohydrate antigens*, TACAs) (Abbildung 2). Die veränderte Glykosylierung ist bedingt durch Modifizierungen und verstärkte oder verringerte Expression von Enzymen, die an der Glykanbiosynthese beteiligt sind, wie zum Beispiel Glykosyltransferasen und Glykosidasen (Rodrigues Mantuano et al. 2020). TACAs beeinflussen das Wachstum, Überleben und die Proliferation sowie das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen und tragen zur tumorinduzierten Suppression von Immunzellen bei. Gleichzeitig stellen TACAs neue diagnostische und therapeutische Angriffspunkte dar. Auf Tumorzellen sind N-Glykane häufig überexprimiert, stärker verzweigt und hypersialyliert (Hoja-Łukowicz et al. 2017). Ebenso kann auf Karzinomzellen die nicht-humane Sialinsäure Neu5Gc auftreten (Yin und Gao 2020). O-Glykane liegen hingegen häufig verkürzt vor, sodass es zum Auftreten der Antigene Tn (GalNAc- α 1-O-Serin/Threonin) und Sialyl-Tn mit zusätzlich terminaler Neu5Ac (STn) kommt. Diese Antigene sind tumorassoziert und treten auf normalen Zellen nicht auf (Hoja-Łukowicz et al. 2017, Rodrigues Mantuano et al. 2020). Ebenso überexprimieren einige Tumorzellen die Lewis-Kohlenhydratantigene (Lewis X, Lewis Y sowie die sialylierten Formen Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis A), die sich terminal an O- und N-Glykanen befinden. Lewis-Strukturen sind Tri- bzw. Tetrasaccharide, die aus an GlcNAc gebundener Galactose (in sialylierter Form plus α 2-3 gebundener Neu5Ac) und Fucose bestehen (Köttgen et al. 2003, Thurin 2021).

Sialyl-Lewis A und Sialyl-Lewis X kommen beispielsweise bei Überexpression auf Krebszellen von soliden Tumoren eine Rolle bei der hämatogenen Metastasierung zu. Die beiden Tetrasaccharide dienen als Liganden für die Bindung an E-Selektin auf vaskulären Endothelzellen und ermöglichen damit die Extravasation der Tumorzellen (Vajaria und Patel 2017, Schultz et al. 2012, Hoja-Łukowicz et al. 2017).

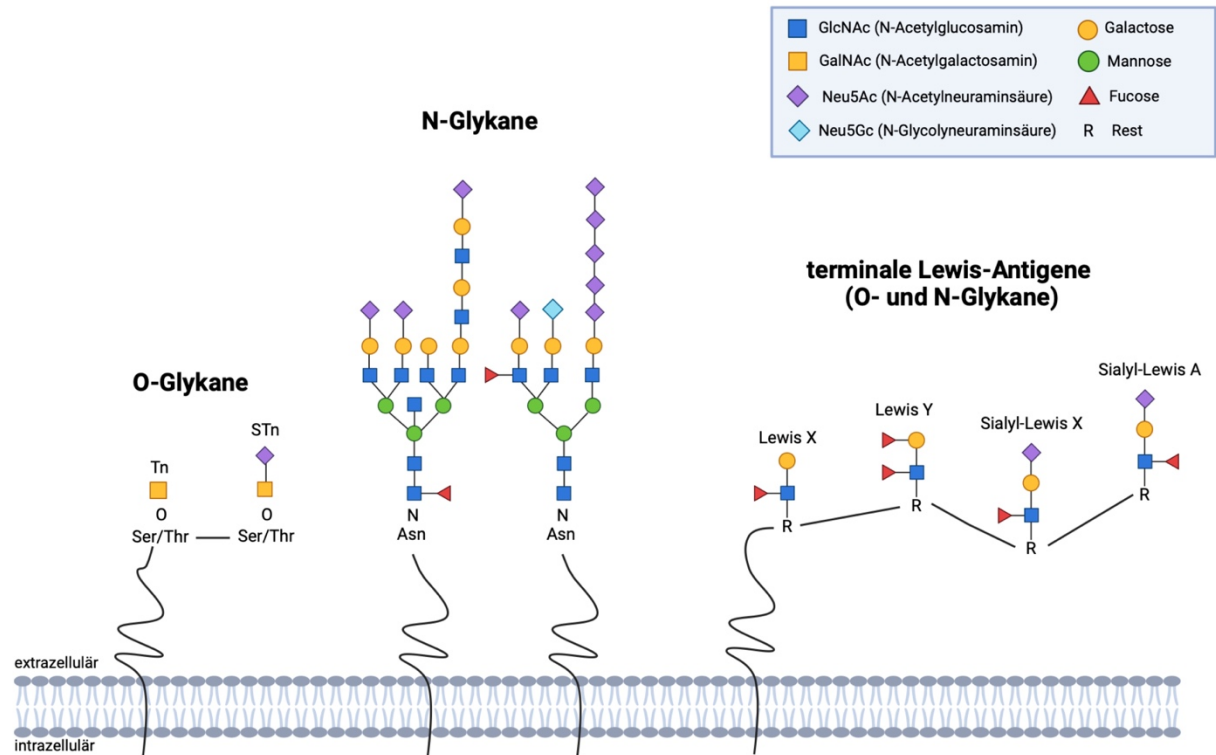


Abbildung 2 Ausgewählte tumorassoziierte Kohlenhydratantigene. Bei Tumorzellen kommt es zum Auftreten bestimmter Markerglykane an der Zelloberfläche – bedingt durch veränderte Expression von an der Glykanbiosynthese beteiligten Enzymen. O-Glykane liegen häufig verkürzt vor, sodass Tumor-assoziierte Neoantigene wie Tn und Sialyl-Tn auftreten. N-Glykane hingegen sind stärker verzweigt. Typisch sind eine erhöhte Fucosylierung und Hypersialylierung. Auch die nicht-humane Sialinsäure N-Glycolyneuraminsäure kann vorkommen. Die Lewis-Antigene befinden sich terminal auf O- und N-Glykanen. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

Ser = Serin, Thr = Threonin, Asn = Asparagin

Aberrante Glykosylierung tritt ebenfalls bei fast allen malignen hämatologischen Erkrankungen auf und damit auch bei der AML und ALL (Pang et al. 2018, Su et al. 2021). Es liegen einige Analysen zu veränderten Glykanstrukturen bei Leukämiezelllinien vor (Blöchl et al. 2021, Wang et al. 2022, Blöchl et al. 2023), zum Teil im Zusammenhang mit Untersuchungen zur *Multiple Drug Resistance* (Zhou et al. 2013, Ma et al. 2015, Pavlikova et al. 2016). Über die Glykanprofile von primären Leukämieproben (ALL, AML) liegen bislang allerdings nur wenige systematische Analysen vor (Pang et al. 2018, Su et al. 2021, Blöchl et al. 2023). Sowohl bei der AML als auch bei der ALL kommt es zu Veränderungen in der N- und O-Glykosylierung der Leukämiezellen. Bei der N-Glykosylierung kommt es

insbesondere zu einer erhöhten Fucosylierung und Hypersialylierung (Pang et al. 2018). Sialyl-Lewis X und A sind bei der AML an der Bildung von Chemoresistenzen beteiligt. Durch die Expression dieser Tetrasaccharide gelingt es den AML-Blasten an E-Selektin auf den Endothelzellen der vaskulären hämatopoetischen Stammzellnische des Knochenmarks zu binden, was zu Retention und über Induktion von Signalkaskaden (AKT/NF- κ B/mTor) zu erhöhtem Überleben der Blasten und damit zur Chemoresistenz beiträgt (Barbier et al. 2020, Blöchl et al. 2023, Pang et al. 2018). Passend dazu ist die Überexpression der beiden Glykosyltransferasen ST3GAL4 und FUT7, die an der Synthese von Sialyl-Lewis X beteiligt sind, mit einem geringerem Gesamtüberleben bei AML-Patienten assoziiert (FUT7: HR 1,023; 95%KI 1,018-1,047; $p < 0,0001$; ST3GAL4: HR: 1,013; 95%KI 1,009-1,016; $p < 0,0001$) (Leonti et al. 2019, Blöchl et al. 2023). Bei der AML spielen weiterhin aberrante Glykosylierungsmuster von Glykosaminoglykanen und bei der ALL von Glykosphingolipiden (v.a. GM3) eine Rolle (Su et al. 2021). So ist in den Lymphoblasten von pädiatrischen ALL-Patienten die mRNA-Expression der GM3-Synthase ST3GAL5 signifikant gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ($p < 0,001$) und positiv mit dem Risikofaktor initiale Leukozytenzahl über $50,000/\text{mm}^3$ korreliert ($p = 0,0016$) (Mondal et al. 2010).

Veränderungen in der Glykosylierung von Zellen sind also wichtige Marker der Tumorentstehung, weshalb Glykane auch potentielle Angriffspunkte für Immuntherapien darstellen. Derzeit werden verschiedene therapeutische Impfstoffe, monoklonale und bispezifische Antikörper, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate und CAR-T-Zelltherapien gegen Kohlenhydratantigene bei verschiedenen Tumorerkrankungen klinisch getestet (Rodrigues Mantuano et al. 2020, Thurin 2021). Auch in der Therapie der AML sind bereits CARs aus monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für das TACA Lewis Y entwickelt worden. Lewis Y wird auf der Oberfläche einiger solider Tumore aber auch auf AML-Zellen überexprimiert, auf Normalgewebe allerdings nur geringfügig exprimiert und eignet sich damit als Zielstruktur für CAR-T-Zellen (Steentoft et al. 2018, Sakamoto et al. 1986). Ritchie et al. haben einen Antikörper-basierten CAR der zweiten Generation gegen Lewis Y entwickelt und in einer Phase-I Studie bei vier Patienten mit rezidivierender, Lewis Y-positiver AML getestet (Ritchie et al. 2013). Trotz des nur kurzanhaltenden therapeutischen Erfolgs zeigt die Studie ein klinisches *proof-of-concept* für CAR-T-Zellen, die auf TACAs bei Leukämiezellen abzielen (Brenner 2013).

1.4 Lektine

Glykane interagieren mit Lektinen, um Zelladhäsions-, Signal- und Kommunikationsprozesse zu vermitteln. Lektine sind lösliche oder membrangebundene

Proteine, die basierend auf Ähnlichkeiten in der Sequenz ihrer kohlenhydraterkennenden Domäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD) in verschiedene Familien eingeteilt werden können. Die weiteren Domänen von Lektinen induzieren intra- und extrazelluläre Signalkaskaden nach Bindung und Erkennung ihrer Zuckerliganden (Köttgen et al. 2003). Drei wichtige Lektinklassen stellen die C-Typ Lektine, die S-Typ Lektine (Galectine) und die I-Typ Lektine (Siglecs) dar.

Die Familie der S-Typ Lektine (Galectine) umfasst 15 Mitglieder. Galectine sind lösliche Proteine, die aus ein bis zwei CRD(s) bestehen und eine Bindungsspezifität für β -Galaktoside aufweisen (Johannes et al. 2018). Galectine liegen meist intrazellulär im Zellkern oder im Zytoplasma vor, können allerdings auch sezerniert werden (Köttgen et al. 2003). Die CRD enthält auch Stellen für Bindungspartner, die keine Glykane darstellen und so interagieren Galectine intrazellulär auch kohlenhydrat-unabhängig mit zytosolischen und nukleären Strukturen (Johannes et al. 2018). Galectine sind an der Regulation von Zellaktivierung, Zellwachstum, Apoptose und Zelladhäsion beteiligt (Köttgen et al. 2003). Auch bei Tumorerkrankungen kommt Galectinen eine Rolle zu: Galectin-1 wirkt beispielsweise apoptose-induzierend auf Effektor-T-Zellen und trägt so zu einem immunsuppressiven Tumormikromilieu und damit zum Tumorwachstum bei (Köttgen et al. 2003, Hattori 2022).

Die C-Typ Lektine stellen eine große und diverse Familie mit über tausend Proteinen dar, die alle mindestens eine C-Typ *Lectin-like* Domänen (CTLDs) besitzen. Einige C-Typ-Lektine haben eine CRD mit einer konservierten Bindungsstelle für Ca^{2+} -Ionen, welche sie für die Bindung ihrer jeweiligen Glykanliganden benötigen. Diese Glykan-bindenden C-Typ CRDs sind von den restlichen C-Typ CRDs abzugrenzen, welche die konservierte Ca^{2+} -Bindungsstelle nicht besitzen und damit keine Glykane, aber andere Liganden wie Lipide und Proteine binden können. Viele C-Typ Lektine werden von Immunzellen exprimiert und haben diverse Funktionen wie die Vermittlung von Zelladhäsion oder die Beteiligung an der Erkennung von „Selbst“ und „Fremd“ (Drickamer und Taylor 2015, Brown et al. 2018). In diesem Projekt verwendete C-Typ Lektine sind CD301 (synonym *C-type lectin domain family 10 member A*, CLEC10A und *Macrophage galactose-type lectin*, MGL), der *Scavenger Receptor C-type Lectin* (SRCL) sowie der *Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN).

CD301 bindet spezifisch an Oligosaccharide mit terminalem GalNAc, insbesondere an das Tn- (van Vliet et al. 2005) und STn-Antigen und wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Mortezai et al. 2013).

SRCL wird hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert. Das Lektin besteht aus einer intrazellulären, Transmembran- und extrazellulären Domäne. Der extrazelluläre Teil enthält ein Coiled-Coil-Motiv mit drei α -Helices sowie eine Kollagen-ähnliche Region und die C-terminal gelegene CRD. Insgesamt ist SRCL dabei als stabiles Trimer organisiert (Coombs et al. 2005). SRCL bindet selektiv an das Trisaccharid Lewis X und etwas schwächer auch an Lewis A. Dieses vergleichsweise hoch spezifische Bindungsmuster ist untypisch für andere C-Typ CRDs. Aufgrund der Expression von Lewis X auf verschiedenen Leukozyten-Unterformen und der endothelialen Lage von SRCL dient dieses Lektin potentiell als Adhäsionsmolekül für Immunzellen (Coombs et al. 2005, Feinberg et al. 2007). Damit kommt SRCL auch eine Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen zu. Elola et al. konnten zeigen, dass SRCL an der Adhäsion zwischen vaskulären Endothelzellen und der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 beteiligt ist – ähnlich der Interaktion zwischen Sialyl-Lewis X und A mit den Selektinen (Elola et al. 2007).

DC-SIGN bindet präferentiell an N-glykosylierte Mannose-reiche Oligosaccharide sowie an Oligosaccharide mit terminaler Fucose (inkl. Blutgruppen-Antigene A und B, Lewis Y, Lewis X, Lewis A) und wird hauptsächlich auf dendritischen Zellen exprimiert (Guo et al. 2004). Auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen kommen den C-Typ Lektinen eine Bedeutung zu. So zeigt DC-SIGN zum Beispiel eine erhöhte Bindung an ALL-Blasten aufgrund aberranter Oberflächenglykosylierung im Vergleich mit peripheren Blutzellen gesunder Spender. Eine hohe Bindung peripherer Blasten von B-ALL-Patienten an DC-SIGN war dabei mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Die erhöhte Bindung an DC-SIGN auf dendritischen Zellen trägt zum *Immunescape* von ALL-Zellen bei (Gijzen et al. 2008, Su et al. 2021).

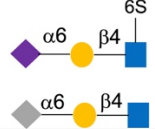
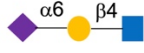
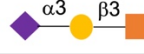
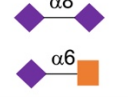
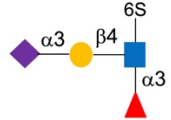
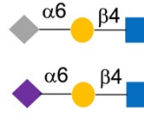
Die zu den I-Typ Lektin gehörenden *Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins* (Siglecs) werden vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Der Aufbau von Siglecs setzt sich aus einer terminalen V-set Immunglobulin-Domäne (Sialinsäure bindende CRD), einer variablen Anzahl von ein bis 16 C2-set Immunglobulin-Domänen, einer Transmembrandomäne und verschiedenen intrazellulären Domänen zusammen. Vor allem durch das Vorhandensein der zyttoplasmatischen *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM)-Domäne erzielen die meisten Siglecs nach Ligandenbindung eine inhibitorische Wirkung (Inhibition von Aktivierung und Proliferation oder Apoptoseinduktion) auf die Siglec-exprimierenden Immunzellen (Crocker et al. 2007, Macauley et al. 2014). Siglec7 beispielsweise besitzt neben der Sialinsäure-bindenden V-set Domäne zwei C2-set Immunglobulin-Domänen, welche als Abstandshalter zwischen CRD und Plasmamembran dienen. Intrazellulär beinhaltet Siglec7 eine ITIM- und eine ITIM-like-Domäne (Yamakawa et al. 2020). Siglec7 wird vor allem auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert,

welche als Teil des angeborenen Immunsystems an der Erkennung von „Selbst“ und „Fremd“ und damit auch von veränderten Tumorzellen beteiligt sind. Dabei spielt auch Siglec7 als inhibitorischer Rezeptor eine Rolle. Bei Bindung an seine Liganden auf den entsprechenden Zielzellen kommt es zu einer verminderten Aktivierung der NK-Zelle (Macauley et al. 2014).

Siglec4a (*synonym Myelin-associated Glycoprotein, MAG*) wird im Gegensatz zu den anderen Siglecs ausschließlich auf Oligodendrozyten und Schwann-Zellen exprimiert. Siglec4a inhibiert das Auswachsen von Neuriten und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Myelinscheide (Blixt et al. 2003, McKerracher et al. 1994).

Die beim Menschen bekannten Siglecs werden in die Gruppe der evolutionär konservierten CD22-verwandten Siglecs mit deutlichen DNA-Sequenzunterschieden (Siglec1, Siglec2, Siglec4a und Siglec15) und in die CD33-verwandten Siglecs (Siglec3, Siglec5, Siglec6, Siglec7, Siglec8, Siglec9, Siglec10, Siglec11, Siglec14) eingeteilt, welche etwa 50-99% identische DNA-Sequenzen zeigen und sich verhältnismäßig schnell entwickelt haben. Alle Siglecs binden an Sialinsäuren, die sich hauptsächlich terminal an Glykanen befinden und zeigen dabei überlappende Affinitäten zu diesen. So binden alle Siglecs mit geringer Affinität an Glykanstrukturen mit an Galactose α 2-3- und α 2-6-glykosidisch gebundener Neu5Ac. Dennoch hat jedes Siglec spezifische Präferenzen und ein charakteristisches Bindungsprofil für bestimmte Sialinsäure-haltige Glykane (Crocker et al. 2007). Siglec2 (*synonym CD22*) bindet besonders an Neu5Gc(α 2-6)Gal(β 1-4)-GlcNAc-Verbindungen und Neu5Ac(α 2-6)Gal-(β 1-4)-GlcNAc-Verbindungen mit Sulfat. Siglec3 (*synonym CD33*) zeigt ebenfalls eine Präferenz für Neu5Ac(α 2-6)Gal-Verknüpfungen. Siglec4a bindet präferentiell an Neu5Ac(α 2-3)Gal-haltige Glykanstrukturen (Blixt et al. 2003, Macauley et al. 2014). Siglec5 bindet besonders an Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac-Strukturen sowie an Sialyl-Tn (Neu5Ac(α 2-6)GalNAc) (Angata et al. 2006, Macauley et al. 2014). Siglec7 bindet präferentiell an Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac-haltige Glykane. Siglec9 hat eine Bindungsspezifität für Glykanstrukturen, die sowohl Sialinsäuren als auch Sulfat enthalten (Crocker et al. 2007). Siglec10 bindet, ähnlich wie Siglec2, an Neu5Gc- oder Neu5Ac(α 2-6)Gal-(β 1-4)-GlcNAc-Verbindungen (Crocker et al. 2007, Macauley et al. 2014). Tabelle 1 fasst die Expression der in diesem Projekt verwendeten Siglecs bezüglich der Expression auf den jeweiligen Zellen sowie ihre spezifischen Glykan-Affinitäten in schematischer Abbildung zusammen.

Tabelle 1 Zusammenfassung der verwendeten I-Typ Lektine (Siglecs) bezüglich ihrer Expression auf verschiedenen Zellen und ihrer Bindungspräferenzen an spezifische Sialinsäure-haltige Glykane. Die Glykanstrukturen sind mit ihrer α - bzw. β -glykosidischen Bindung schematisch abgebildet. NK-Zellen = Natürliche Killerzellen

I-Typ Lektin	Expression	Bindungsspezifität	Referenzen
Siglec2	B-Zellen		Macauley et al., 2014 Blixt et al., 2003
Siglec3	Myeloide Vorläuferzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mikroglia		Macauley et al., 2014
Siglec4a	Oligodendrozyten, Schwann-Zellen		Macauley et al., 2014 Blixt et al., 2003
Siglec5	Neutrophile, Monozyten, B-Zellen		Macauley et al., 2014 Angata et al., 2006
Siglec7	NK-Zellen, Monozyten, Mastzellen		Crocker et al., 2007 Macauley et al., 2014
Siglec9	Monozyten, Neutrophile dendritische Zellen, NK-Zellen		Crocker et al., 2007 Macauley et al., 2014
Siglec10	B-Zellen, Monozyten, Eosinophile		Crocker et al., 2007 Macauley et al., 2014



Auch bei Tumorerkrankungen spielen Siglecs in verschiedener Weise eine Rolle. Die Hypersialylierung von Tumorzellen bedeutet eine verstärkte Expression von Liganden für Siglecs. Die Bindung der entsprechenden sialylierten Antigene führt zu einer inhibitorischen Antwort der Immunzellen und damit zum *Immunescape* von Tumorzellen (Rodríguez et al. 2018). So führt die verstärkte Sialylierung auf Tumorzellen über die Bindung an Siglec7 auf NK-Zellen zu deren Inhibition, wodurch das Erkennen und Eliminieren der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* verhindert wird (Jandus et al. 2014, Hudak et al. 2014). Huang et al. konnten passend dazu zeigen, dass Siglec7-negative NK-92MI-Zellen eine höhere zytotoxische Aktivität gegenüber vier verschiedenen Leukämiezelllinien aufwiesen als Siglec7-positive NK-92MI-Zellen (Huang et al. 2018).

Neben der Hypersialylierung von Glykanstrukturen, die über die Bindung an Lektine Einfluss auf die Wirkung von Immunzellen haben, können Tumorzellen auch selbst veränderte Muster in der Expression von Lektinen zeigen. So können Lektine ebenfalls zu Angriffspunkten von Immuntherapien werden (Rodríguez et al. 2018). Da Siglecs fast

ausschließlich auf Immunzellen exprimiert werden, eignen sich Siglec-spezifische Immuntherapien insbesondere für die Therapie von Leukämien und Lymphomen. Siglec-spezifische Antikörper, die sich gegen Siglec2 (CD22) bei ALL und Siglec3 (CD33) bei AML richten, sind zum Teil bereits zugelassen oder befinden sich in klinischer Testung (Macauley et al. 2014, Pourmontaseri et al. 2022). CAR-T-Zellen, die sich gegen Siglec2 (CD22) richten, werden als Einzel-CAR (Pan et al. 2019) oder als bispezifische CARs in Kombination mit CD19 (Dai et al. 2020) in der Behandlung der ALL klinisch getestet. Darüber hinaus haben Jetani et al. einen Siglec6-spezifischen CAR entwickelt und einen Effekt dieser CAR-T-Zellen gegen AML-Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Jetani et al. 2021).

1.5 Lektin-basierte CARs

In den letzten Jahren sind verschiedene Antikörper-basierte CARs mit Spezifität für TACAs wie z.B. TAG72, Lewis Y, GD2 und Tn-MUC1 entwickelt worden (Steentoft et al. 2018). Statt eines Antikörperfragments (scFv) kann allerdings auch die CRD eines Lektins zur spezifischen Bindung von Glykanstrukturen in einem CAR-Konstrukt verwendet werden (Abbildung 3A). Es wurde bereits eine geringe Anzahl Lektin-basierter CARs mit Spezifität für TACAs entwickelt und größtenteils im Zusammenhang mit soliden Tumorentitäten präklinisch getestet. Meril et al. haben Lektin-basierte CARs der zweiten Generation mit den Ektodomänen von Siglec7 und Siglec9 entwickelt. Dabei konnten sie eine spezifische zytotoxische Aktivität für sowohl den Siglec7- als auch den Siglec9-CAR gegen verschiedene Zelllinien (solide Tumore und Leukämie) nachweisen. Die beiden CARs zeigten ebenfalls eine spezifische antitumorale Wirkung in einem Xenograft-Mausmodell mit einer humanen Melanomzelllinie mit signifikant verzögertem Tumorstadium und erhöhter Überlebensdauer ohne relevante Nebenwirkung der mit der CAR-Therapie behandelten Mäuse (Meril et al. 2020). Diese Ergebnisse stellen ein *proof-of-concept* für die Verwendung von humanen Siglec-Domänen in Lektin-basierten CARs zur Erkennung von TACAs dar.

Meléndez et al. haben verschiedene Lektin-basierte CARs gegen das Globotriaosylceramid (Gb3) entwickelt, welches von verschiedenen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Kolorektalem Karzinom und Burkitt-Lymphom überexprimiert wird. Im Unterschied zu Meril et al. stammen die Gb3-bindenden Lektindomänen in diesen Zweitgenerations-CARs von Bakterien (*Shigella dysenteriae* und *Pseudomonas aeruginosa*) und der Mittelmeer-Miesmuschel (*Mytilus galloprovincialis*). Die Autoren konnten eine spezifische Zytotoxizität ihrer Lektin-basierten CAR-T-Zellen gegen Zelllinien vom Burkitt-Lymphom, Kolorektalen Karzinom und Mammakarzinom nachweisen (Meléndez et al. 2022).

Franke et al. aus unserer Arbeitsgruppe (AG) haben erstmals einen CAR auf Basis eines humanen C-Typ Lektins zur Erkennung von TACAs publiziert. In diesem CAR bindet die CRD von CD301 an Tn und STn, die auf Zellen von verschiedenen soliden Tumoren überexprimiert werden. Dafür wurde die scFv eines Zweitgenerations-CAR (mit CD28 und CD3 ζ) durch die C-Typ Lektindomäne von CD301 ersetzt. Insgesamt drei verschiedene CD301-CARs wurden getestet: CD301, CD301 mit einem zusätzlichen Glycin-Serin-Linker (zwischen der CRD und IgG) und CD301 mit Linker und Myc-Tag. Die CD301-CARs in NK92-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte spezifische Zytotoxizität gegenüber Tn/STn-positiven Brustkrebszelllinien. Im direkten Vergleich der CARs untereinander konnte die zytotoxische Aktivität durch den eingebauten Linker zusätzlich gesteigert werden (Franke et al. 2023). Darüber hinaus konnten Prasse et al. aus unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass derselbe CD301-CAR (ohne Linker und Myc-Tag) in NK92-Zellen auch gegen Tn/STn-positive Osteosarkomzelllinien spezifisch zytotoxisch aktiv war (Prasse et al. 2024).

McKenna et al. haben einen Zweitgenerations-CAR auf Basis eines modifizierten pflanzlichen Lektins aus der Banane entwickelt. Dieser H84T-BanLec-CAR bindet an Mannose-reiche Oligosaccharide, die sich als TACA sowohl auf Pankreastumorzellen als auch auf den Zellen des tumorassoziierten Stromas befinden. Durch diese duale spezifische Bindungsmöglichkeit wird gleich zwei Problemen der CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren begegnet: zum einem der Heterogenität von tumorspezifischen Antigenen und zum anderen dem erschwerten Zugang der CAR-T-Zellen zu den malignen Zellen aufgrund der Tumormikroumgebung. Die Autoren konnten nachweisen, dass die H84T-CAR-T-Zellen in 3D-*in-vitro*-Modellen Pankreaskarzinomzelllinien töten und die Gewebsarchitektur des tumorassoziierten Stromas stören konnten. Diese Ergebnisse konnten in Xenograft-Mausmodellen ohne relevante Toxizität auf Normalgewebe bestätigt werden (McKenna et al. 2023).

Es liegt also ein *proof-of-concept* für sowohl humane als auch pflanzliche Lektin-basierte CARs in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen vor. Unter den humanen Lektinen zeigten sowohl Siglec- als auch C-Typ-Lektin-basierte CARs eine vielversprechende antitumorale Wirkung. In dieser Arbeit werden ebenfalls Lektin-basierte CARs, im Folgenden LEC-CARs genannt, mit der CRD von humanen Siglecs und C-Typ-Lektinen in NK92-Effektorzellen untersucht. Allgemein ist die Affinität eines Lektins mit seiner CRD zu den jeweiligen Glykanstrukturen ungefähr 1000-mal schwächer als die Affinität von Antikörper-Antigen-Bindungen (Cummings et al. 2015). Deshalb könnte die Kombination von zwei CRDs über einen Glycin-Serin-Linker in einem Fusions-LEC-CAR die Avidität, die zytotoxische Effizienz und die Spezifität der LEC-CAR tragenden Effektorzellen weiter steigern und ist daher Gegenstand dieser Arbeit (Abbildung 3B).

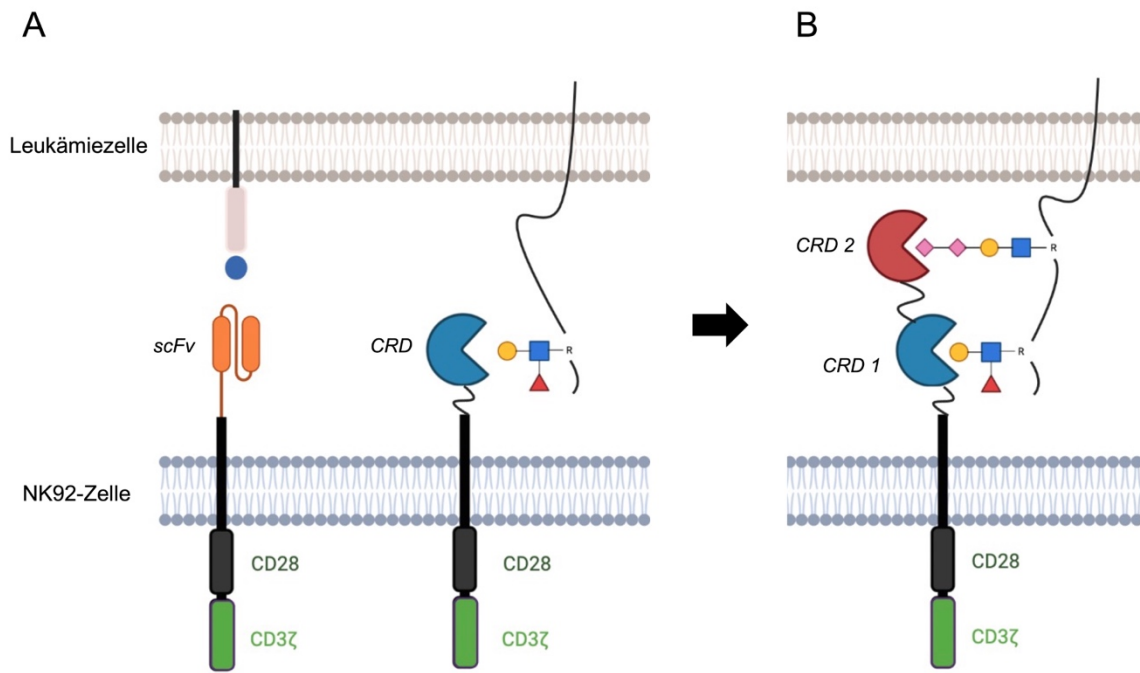


Abbildung 3 Aufbau von LEC-CARs. (A) Der konventionelle CAR der zweiten Generation besteht aus einem Antikörperfragment (*single-chain variable fragment*, scFv) zur Erkennung von Antigenstrukturen auf den Zielzellen, einer Transmembrandomäne, der costimulatorischen Domäne CD28 sowie der intrazellulären Signaldomäne CD3ζ (links). Beim Lektin-basierten CAR (LEC-CAR) bindet die *carbohydrate recognition domain* (CRD) eines Lektins an spezifische Glykanstrukturen auf der Oberfläche der Zielzellen, hier Leukämiezellen (rechts). (B) In einem Fusions-LEC-CAR werden zwei verschiedene CRDs über einen Glycin-Serin-Linker miteinander kombiniert. Die Abbildung wurde mit *Biorender.com* erstellt.
scFv = *single-chain variable fragment*, CRD = *carbohydrate recognition domain*

1.6 Ziel dieser Arbeit

Trotz verbesserter Chemotherapie-Protokolle und der Möglichkeit einer HSZT ist die Leukämie bei einigen Kindern refraktär oder rezidivierend. In diesen Fällen stellen spezifische Immuntherapien wie eine CAR-T-Zelltherapie eine Behandlungsoption dar. Für die Therapie der B-ALL werden bereits CD19-CAR-T-Zellen klinisch eingesetzt, für die AML konnte allerdings noch keine CAR-T-Zelltherapie zugelassen werden, da bisher keine spezifischen Proteinantigene ohne relevante Überschneidung mit normalen hämatopoetischen Zellen als Zielstruktur auf der Oberfläche von AML-Blasten gefunden werden konnten. Hier stellen aberrante, tumorspezifische Glykane einen neuen Angriffspunkt für eine CAR-T-Zelltherapie dar. Während die Bindungsspezifität von konventionellen CARs durch Antikörperfragmente (scFv) bedingt ist, wird in dieser Arbeit die CRD von Lektinen in sogenannten LEC-CARs zur Erkennung spezifischer Kohlenhydratantigene auf der Oberfläche von Leukämiezellen genutzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst die Oberflächenglykosylierung von primären pädiatrischen und adulten Leukämieproben (ALL und AML) mittels zehn verschiedener rekombinanter humaner Lektine durchflusszytometrisch zu untersuchen, um neue

Erkenntnisse über potentielle Zielstrukturen für eine CAR-T-Zelltherapie zu erlangen. Zum Vergleich der spezifischen Glykosylierungsmuster werden analog auch Zellen des hämatopoetischen Systems (peripheres Blut und Knochenmark) gesunder Spender untersucht. Daraufhin werden die vielversprechendsten Lektindomänen für die Generierung der LEC-CARs ausgewählt. Die CRDs dieser Lektine werden anschließend an ein konventionelles CAR-Rückgrat der zweiten Generation fusioniert. Für die Überprüfung der Hypothese, dass die Kombination von zwei CRDs in einem Fusions-LEC-CAR die Spezifität und zytotoxische Effektivität im Vergleich mit LEC-CARs mit monomerer CRD steigern kann, werden in diesem Projekt neben Einzel-LEC-CARs auch die CRDs zweier verschiedener Lektine in einem Tandem-CAR-Konstrukt fusioniert. Dabei wird auch die potentiell überlappende Glykanexpression auf anderen sensiblen Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems in der Auswahl berücksichtigt. Dann werden NK92-Zellen, die in dieser Arbeit als Effektorzellen dienen, mit den LEC-CAR-Konstrukten viral transduziert. Nach Überprüfung der Oberflächenlokalisierung und Untersuchung der Bindungseigenschaften der LEC-CARs werden die LEC-CAR tragenden NK92-Zellen hinsichtlich ihrer Spezifität und Effektivität gegenüber geeigneten Leukämiezelllinien in Bezug auf Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Reinstwasser wurde mit dem *Milli-Q® Advantage A10* hergestellt und wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96 well – Flachboden – unbehandelt - schwarz	Thermo Fisher Scientific
Drigalskispatel	ISOLAB Laborgeräte
Einmalspritzen (30 ml)	Becton Dickinson
FACS-Röhrchen	
- 5ml, 75x12mm Rundbodenröhrchen	- Sarstedt
- 5ml, 75x12mm Rundbodenröhrchen mit Kappe	- Falcon
- 5ml, 75x12mm Rundbodenröhrchen mit in der Kappe integriertem Zellsieb	- Falcon
Kryoröhrchen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reagiergefäße (1,5 ml / 2,0ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ² Wachstumsfläche)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Vertiefungen), Flachboden und Rundboden	Sarstedt
Zellkulturschalen (Ø 6cm)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (15 ml, 50 ml)	Greiner

2.1.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Name	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	- HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
	- HERAcell 240i	
Durchflusszytometer	- BD FACSCanto™	- Becton Dickinson
	- BD FACS Aria™ Fusion Cell Sorter	- Becton Dickinson
	- MacsQuant® Analyzer 10	- Miltenyi Biotec
	Flow Cytometer	
Elektrophorese-Kammer	- Compact S	Analytik Jena
	- Compact XS/S	
	- Agagel Standard ohne Kühlung (Typ G45/1)	
Elektrophorese-Netzgerät	Standard Power Pack P25	Analytik Jena

Material und Methoden

Fluoreszenzmikroskop	Nikon eclipse Ts2R	Nikon
Heizblock	- ThermoMixer comfort - ThermoMixer C - Trockenblockheizsystem Serie BTD	- Eppendorf - Eppendorf - Thermo Scientific Fisher
Licht-Mikroskop	- LEICA DMIL - Nikon eclipse Ts2R	- Leica Camera - Nikon
Mikrobiologischer Brutschrank	- Heraeus B12 Function line - MaxQ 6000	Thermo Scientific Fisher
Pipetten (0-10 µl, 10-100 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf Research Plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Plattenreader	VarioSkan Lux	Thermo Scientific Fisher
Rotator	SB3	Stuart
Schüttelinkubator	- New Brunswick™ innova® 44 - MaxQ 6000	- Eppendorf - Thermo Scientific Fisher
Sicherheitswerkbank	- HERA safe KS12 - Maxisafe 2020 - MSC-Advantage	Thermo Scientific Fisher
Spektrophotometer	- NanoDrop2000 Spectrophotometer - Nanodrop One	Thermo Scientific Fisher
Thermocycler	- TProfessional Thermocycler - TAdvanced	Analytik Jena
Tischzentrifugen	- Heraeus Pico17 Centrifuge - Heraeus Fresco21 Centrifuge - C1301 Mini Centrifuge - Centrifuge 5420	- Thermo Scientific Fisher - Thermo Scientific Fisher - Labnet International - Eppendorf
Überkopfschüttler	Reax2	Heidolph Instruments
UV-Transilluminator	- BioDocAnalyze - E-Box VX2	- Analytik Jena - Vilber
Vortexmischer	- Vortex Mixer SA8 - Reax Top	- Stuart - Heidolph Instruments
Waage	Präzisionswaage ED3202S	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Advantage A10	Merck
Zellzählgerät	Countess 3	Thermo Scientific Fisher
Zellzählkammer	Neubauer improved 0,1m Tiefe/0,0025 mm ²	Brand
Zentrifuge	- Heraeus Multifuge 3S-R - Heraeus Megafuge 40R	- Thermo Scientific Fisher

- Centrifuge 5810 R	- Thermo Fisher
- Rotina 48	- Scientific
	- Eppendorf
	- Hettich Lab

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bestellnummer	Hersteller
2-Propanol	1.09634.2511	Merck
6x TriTrack DNA Loading Dye	R1161	Thermo Fisher Scientific
7-AAD Viability Staining Solution	420404	Biolegend
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	P726.1	Carl Roth
Ampicillin Sodium Salt	A9518	Sigma-Aldrich
Aqua	388 0087	B. Braun
Bakterienstamm JM109	P975A	Promega
BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (mit Monensin)	554724	Becton Dickinson
BD Pharm Lyse™ Lysing buffer	555899	Becton Dickinson
Calcein-AM	56496 206700	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	HN04.1	Carl Roth
Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	244620	Becton Dickinson
Dimethylsulfoxid z.A.	2347.1000	Chemsolute
dNTP Mixture	4030	Takara
Essigsäure 100%	6755.2	Carl Roth
Ethanol absolute for analysis	1009832500	Merck
Ethidiumbromidlösung	2218.1	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-Na ₂)	8043.1	Carl Roth
Formaldehydlösung 37%	CP10.2	Carl Roth
GeldRed® Nucleic Acid Gel Stains	41003	Biotium
GeneRuler 100bp Plus DNA ladder	SM0321	Thermo Fisher Scientific
Human TruStain FcX™	422302	Biolegend
Ionomycin Calcium Salt	5608212	Pepro Tech
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	P748.1	Carl Roth
LB-Agar (Luria/Miller)	X969.2	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1.058.331.00	Merck
MTT Dye Solution	G4102	Promega
PMA	P8139	Sigma-Aldrich
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	107689-10G	Sigma-Aldrich
ROTI® GelStain	3865.2	Carl Roth
Solubilization Solution/Stop Mix	G4101	Promega
TAE-Puffer (50x)	A1691,100	AppliChem
Triton X® 100	3051.4	Carl Roth
Trypan Blue Solution (0,4%)	T8154	Sigma-Aldrich
Tween® 20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	8022.0500	Chemsolute

UltraPure™ Agarose	16500-500	Thermo Fisher Scientific
--------------------	-----------	--------------------------

2.1.4 Puffer

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffername	Bestandteile	Verwendung
C-Typ-Lektin-Waschpuffer	für 10 ml: - 10 µl CaCl ₂ [1M] - 20 µl MgCl ₂ [1M] - 10 ml PBS	Binde- und Waschpuffer für Färbungen mit C-Typ-Lektinen
FACS-Puffer	- 2% fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (h.i.) - in PBS	Waschpuffer und Lösung für durchflusszytometrische Untersuchungen
10x ACK-Lysepuffer	- 150mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) - 10mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) - 0,1mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-Na ₂) - in ddH ₂ O	Erylyse von peripherem Blut und Knochenmark

2.1.5 Reaktions-Kits

Tabelle 6: Reaktions-Kits

Produkt	Bestellnummer	Hersteller
CloneJET PCR Cloning Kit	K1231	Thermo Fisher Scientific
Human IFN gamma Uncoated ELISA	88-7316	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	L3000-015	Thermo Fisher Scientific
Mix & Go! <i>E.coli</i> Transformation Kit and Buffer Set	T3001	Zymo Research
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	740727.250	Macherey-Nagel
One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E.coli</i>	C404003	Thermo Fisher Scientific
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	12163	Qiagen
QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit	28506	Qiagen

2.1.6 Antikörper, Glykokonjugate, rekombinante Proteine und Isotypen

Tabelle 7: Antikörper

Produkt	Klon	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
APC anti-human CD10	HI10a	982202	B332579	Biolegend
APC anti-human CD3 Antikörper	HIT3a	300312	B193631	Biolegend

BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, k/Negative Control Compensation Particles Set	/	552843	/		Becton Dickinson
c-Myc Antikörper B	9E10	sc-40 B	C0119		Santa Cruz Biotechnology
CD34 Antikörper, anti- human, FITC	AC136	130-113-178	- 5200601706 - 5210404684		Miltenyi Biotec
CD56 Antibody, anti-human, FITC, REAffinity™	REA196	130-114-549	- 5201205227 - 5210708579		Miltenyi Biotec
Goat anti-human IgG Fc gamma, R-Phycoerythrin conjugated	/	GtxHu-004-EPE	- 53-126-032619 - 78-78-061521		Immuno- Reagents
Goat IgG (H+L) APC-conjugated Antibody	/	F0108	LXE0615021		R&D Systems
Human Siglec- 10 Antikörper	/	AF2130	KRE012006A		R&D Systems
Human Siglec- 7/CD328 Biotinylated Antibody	/	BAF1138	IY013051		R&D Systems
Human Siglec-9 Biotinylated Antibody	/	BAF1139	IFW0118091		R&D Systems
PE/Cy7 anti- human CD107a (LAMP-1) Antibody	H4A3	328618	- B284259 - B333360		Biolegend
PE/Cyanine7 anti-human CD38 Antikörper	HIT2	303515	/		Biolegend

Tabelle 8: Glykokonjugate

Produkt	Klon	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
(Sia) ₃ PAA-biot	/	73-BP	/	GlycoNZ
6' SLN PAA-biot	/	997-BP	/	GlycoNZ
Aminoglucitol PAA-biot	/	0000-BP	/	Lectinity
Lewis ^x PAA-biot	/	0044-BP	/	Lectinity

SiaLe ^x -6 ^(GlcNAc) -	/	20-BP	/	GlycoNZ
O-sulfate PAA-biot				

Tabelle 9: Rekombinante Proteine

Produkt	Klon	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
c-Myc Alexa Fluor647	9E10	sc-40AF647	K0137	Santa Cruz Biotechnology
Recombinant Human DC-SIGN/CD209 Fc Chimera Protein, CF	/	161-DC	NCQ4220091	R&D Systems
Recombinant Human MAG/Siglec-4a Fc Chimera Protein, CF	/	8940-MG	- DFEH0119031 - DFEH0121011	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-10 Fc Chimera Protein, CF	/	2130-SL	- IJR0519101 - IJR0520011	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-2/CD22 Fc Chimera Protein, CF	/	1968-SL	- GER2418061 - GER2620111	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-3/CD33 Fc Chimera Protein, CF	/	1137-SL	- FYK0517071 - FYK0620101	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-5 Fc Chimera Protein, CF	/	1072-SL	- FPO0718101 - FPO0820061	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-7/CD328 Fc Chimera Protein, CF	/	1138-SL	- FXW0418081 - FXW0420071	R&D Systems
Recombinant Human Siglec-9 FC Chimera Protein, CF	/	1139-SL	- FVM0518091 - FVM0621031	R&D Systems

Streptavidin, AlexaFluor® 647 conjugate	/	S32357	1369669	Thermo Fisher Scientific
Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate (SAPE)	/	S866	1485205	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 10: Isotypen

Isotyp	Klon	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
FITC Mouse IgG2a, k Isotype Ctrl (FC) Antikörper	MOPC-173	400210	B127491	Biolegend
Normal Goat IgG Biotinylated Control	/	BAF108	XS1519071	R&D Systems
Normal Goat IgG Control	/	AB-108-C	ES4119121	R&D Systems
PE/Cyanine7 IgG1, k Isotype controle	MOPC-21	400126	B308653	Biolegend
PE/Cyanine7 IgG1, k Isotype Ctrl Antikörper	MOPC-21	400126	B136047	Biolegend
REA Control (S)-FITC human	/	130-104-610	5170523228	Miltenyi Biotec

2.1.7 Zellkultur

Tabelle 11: Materialien für die Zellkultur

Produkt	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
0.05% Trypsin-EDTA (1x)	25300-054	/	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x)	41965-039	/	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1x)	14190-094	/	Thermo Fisher Scientific
Fötales Kälberserum (FBS), qualified	10270-106	- 42F1384K - 2324371	Thermo Fisher Scientific
humanes IL-2	200-02	- 111812-1 - L118 - 102012 - D1921	Pepro-Tech
L-Glutamine (100x)	25030-024	/	Thermo Fisher Scientific
MEM Alpha (1x)	12561-056	/	Thermo Fisher Scientific

Minimum Essential Medium Eagle	M4526	/	Sigma-Aldrich
Opti-MEM® I (1x) Reduced Serum Medium	31985-070	/	Thermo Fisher Scientific
Penicillin Streptomycin (10.000 Units/mL Penicillin + 10.000 µl/mL Streptomycin)	15140-122	/	Thermo Fisher Scientific
Pferdeserum, Herd	Donor H1270	- 19J169 - 19K444	Sigma-Aldrich
RPMI Medium 1640 (1x)	21875-034	/	Thermo Fisher Scientific

2.1.8 Enzyme und Enzympuffer

Tabelle 12: Enzyme und Enzympuffer

Produkt	Bestellnummer	Lot-Nummer	Hersteller
10x FastDigest Green buffer	B72	00780413	Thermo Fisher Scientific
10x T4 DNA Ligase Buffer	B69	00111328	Thermo Fisher Scientific
5x Phusion® HF Reaction Buffer	B0518S	0071804	New England BioLabs
DreamTaq Green Master Mix (2x)	K1081	01026116	Thermo Fisher Scientific
FastDigest BamHI	FD0055	00735974 01027063	Thermo Fisher Scientific
FastDigest RruI	FD2154	00918105 00960002 01094715	Thermo Fisher Scientific
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	M0530S	0051803	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	EL0016	01019336	Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Primer

Die verwendeten Primer für die Klonierung sind in Anhang-Tabelle I im Anhang und die Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung in Anhang-Tabelle II im Anhang aufgeführt.

2.1.10 Vektoren, Plasmide und cDNA

Tabelle 13: Verwendete Vektoren, Plasmide und cDNA

Name	Verwendungszweck	Hersteller
SRCL Klon 1 (Naggi) pcDN3.1 C-J	Herstellung rekombinanter humaner Lektine	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anna-Katharina Franke
CD301 pcDNA 3.1 ZeoR	Herstellung rekombinanter humaner Lektine	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anna-Katharina Franke
human Siglec7/CD328 Versa clone cDNA	Klonierung mit Siglec7	R & D Systems
extrazelluläre Domäne von SRCL	Klonierung mit SRCL	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anna-Katharina Franke
DC-SIGN LEC-CAR pBullet EGFP	Vektor-Vorlage	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anna-Katharina Franke
pcDNA3.MLV.gp	γ-Retrovirus: Gag/Pol	Bestand AG Müller, Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg
phCMV-GALV	γ-Retrovirus: kodiert die Hülle	Bestand AG Müller, Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg
pJET 1.2/blunt	Subklonierung LEC-CARs	Thermo Fisher Scientific
Siglec7-SRCL LEC-CAR pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
SRCL-Siglec7 LEC-CAR in pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
SRCL LEC-CAR in pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
Siglec7 LEC-CAR in pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
SRCL-Siglec7 LEC-CAR Linker in pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
SRCL LEC-CAR Linker in pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker Myc pBullet	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert

SRCL-Siglec7 Linker Myc in pBullet	LEC-CAR	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
SRCL Linker Myc in pBullet	LEC-CAR	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert
Siglec7 Linker Myc in pBullet	LEC-CAR	Generierung der LEC-CARs	während dieser Arbeit kloniert

2.1.11 Softwareprogramme

Tabelle 14: Verwendete Softwareprogramme

Name	Verwendung
BD FACSDiva Software 8.0.2	Aufnahme FACS-Daten
BioDocAnalyse 2.2	Gel-Dokumentation
FlowJo v10.6.1	Auswertung FACS-Daten
GraphPad Prism 8.3.0	Auswertung/Statistik
i-Control	Software vom TecanReader
Leica Application Suite V3.8.0	Aufnahme Fluoreszenzbilder
MACS Quantify 2.13.2	Aufnahme FACS-Daten
NIS-Elements D 5.20.00 64-bit	Aufnahme Fluoreszenzbilder
SkanIt RE 6.1.1	Software vom Varioskan
SnapGene ® 4.3.11	Erstellung von Vektorkarten, Primerdesign
BioRender.com	Erstellung von ausgewählten Abbildungen

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Insgesamt wurden 12 γ -retrovirale Vektoren in dieser Arbeit kloniert (s. Tabelle 13, die dazugehörigen Plasmid-Karten befinden sich im Anhang). Im folgenden Kapitel ist das generelle Protokoll der Klonierung der generierten Vektoren für die LEC-CARs beschrieben.

2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde verschiedene Inserts ausgehend von cDNA bzw. einem Vektor (Tabelle 13) mit geeigneten Primern amplifiziert. Alle Primer wurden lyophilisiert bei Metabion bestellt und durch Zugabe von ddH₂O zunächst eine 100 μ M Lösung hergestellt, dann auf 10 μ M verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

PCR zur Generierung der LEC-CARs

Für die Generierung der LEC-CAR-Konstrukte wurden die Primer aus Anhang-Tabelle I im Anhang mit den angegebenen Sequenzen verwendet. Abbildung 4 zeigt beispielhaft die

verwendeten Primer für die Klonierung des Siglec7-SRCL LEC-CAR und deren Lage im γ -retroviralen Vektor pBullet. Die restlichen Vektorkarten der LEC-CARs mit den jeweiligen zur Klonierung verwendeten Primern befindet sich im Anhang 1 bis Anhang 11.

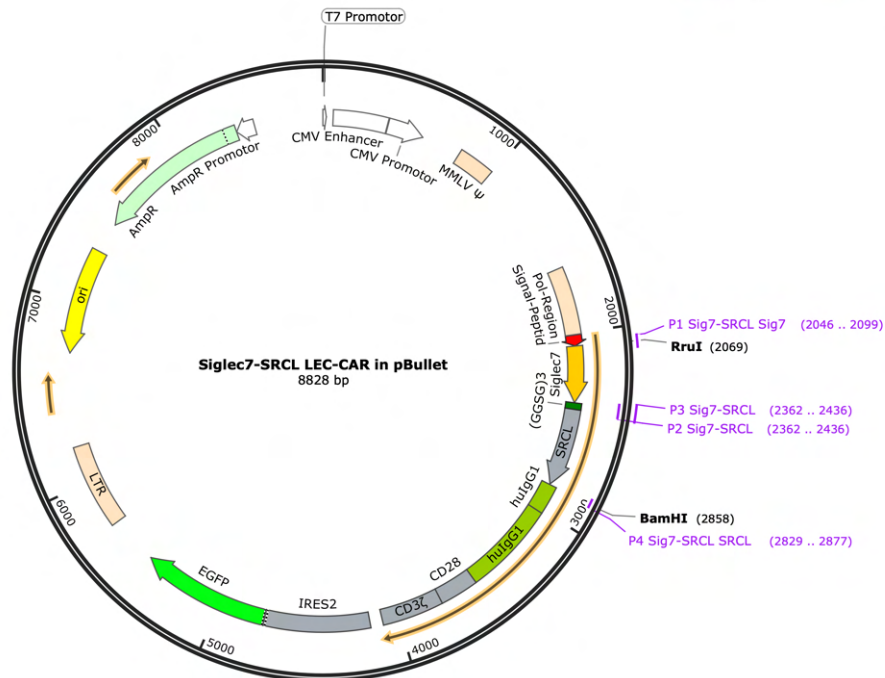


Abbildung 4 Lage der zur Klonierung des Siglec7-SRCL LEC-CARs im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer und Schnittstellen. Das Insert des hier beispielhaft gezeigten Siglec7-SRCL LEC-CAR besteht aus den beiden Lektin-Domänen Siglec7 und SRCL und wurde mit den Primern P1 Sig7-SRCL Sig7, P2 Sig7-SRCL, P3 Sig7-SRCL und P4 Sig7-SRCL SRCL mittels (Fusions-)PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ermöglicht die separate Synthese des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E. coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (GGSG)3 = Glycin-Serin-Linker, huIgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = long terminal repeats, ori = Replikationsursprung, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus, AmpR= Ampicillin-Resistenzgen

In Abbildung 5 ist die Generierung von Fusions-LEC-CARs durch eine Fusions-PCR gezeigt. Dafür wurde zunächst mit der ersten Domäne (z.B. Siglec7) eine PCR 1 mit Primer 1 (mit optionalem Myc-Tag) und Fusions-Primer 2, welcher den Glycin-Serin-Linker zur Trennung der Domänen sowie eine komplementäre Region zur zweiten Domäne (z.B. SRCL) enthält, durchgeführt. In der parallel laufenden PCR 2 wurde der Fusions-Primer 3, welcher ebenfalls einen Anteil des Glycin-Serin-Linkers enthält und der Primer 4, welcher optional einen weiteren Glycin-Serin-Linker (je nach Version des LEC-CARs) enthält, verwendet. Im nächsten Schritt wurde dann mit den aus PCR 1 und 2 entstandenen PCR-Produkten mit Primer 1 und 4 für die Fusions-LEC-CARs ohne Linker bzw. mit den Primern LEC-CAR.for und LEC-CAR.rev für die Fusions-LEC-CARs mit Linker und optionalen Myc-Tag eine Fusions-PCR durchgeführt.

Für die Einzel LEC-CARs wurde die cDNA der CRD von SRCL oder Siglec7 in einer einfachen PCR mit zwei außen liegenden Primern nach dem Schema von Primer 1 und 4 verwendet.

Tabelle 15 zeigt die eingesetzten Reagenzien und ihre Volumina für die PCR 1 und 2, Fusions-PCR und die PCR für die Einzel LEC-CARs.

Tabelle 16 zeigt das dazugehörige PCR-Programm.

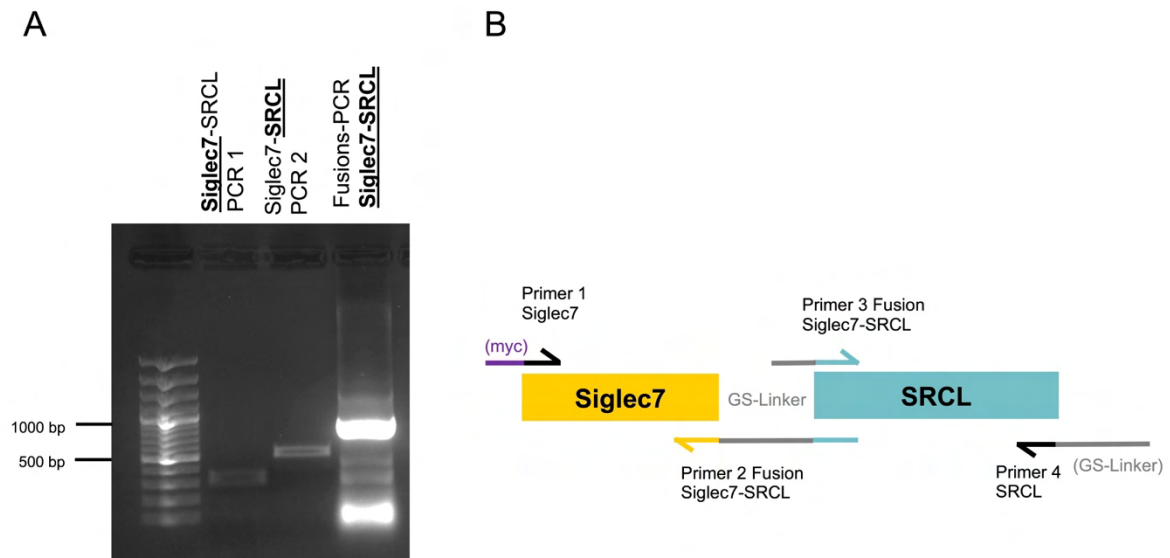


Abbildung 5 Generierung eines Fusions-LEC-CARs mit Linker. (A) Das Gelbild zeigt die DNA-Banden der Produkte von PCR 1 (CRD der Siglec7-Domäne mit Primer 1 und 2) und PCR 2 (CRD der SRCL-Domäne mit Primer 3 und 4) sowie das finale Produkt der Fusions-PCR (Produkte der PCR 1 und 2 mit Primer 1 und 4) am Beispiel der Generierung des Siglec7-SRCL LEC-CARs. (B) Schematische Abbildung der eingesetzten Primer am Beispiel des Siglec7-SRCL LEC-CARs Linker. Primer 1 enthält einen optionalen Myc-Tag und bindet an die Siglec7-Domäne. Der Fusions-Primer 2 enthält Binderegionen von Siglec7, einen Glycin-Serin-Linker zur Trennung beider Domänen und komplementäre Anteile der zweiten Domäne SRCL. Der Fusions-Primer 3 enthält Anteile des Glycin-Serin-Linkers und bindet an die SRCL-Domäne. Primer 4 bindet an die SRCL-Domäne und enthält je nach Version des LEC-CARs optional einen weiteren Glycin-Serin-Linker. myc = Myc-Tag, GS-Linker = Glycin-Serin-Linker

Tabelle 15: Volumina der eingesetzten Reagenzien für die PCR zur Generierung der LEC-CARs

PCR-Reagenz	Volumen [µl]	bzw. Konzentration [ng]
5x Phusion® HF Reaction Buffer		10 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase		0,5 µl
dNTPs		2 µl
Vorwärts-Primer		2,5 µl
Rückwärts-Primer		2,5 µl
DNA		20 ng*
ddH ₂ O		auf 50 µl auffüllen

* In der Fusions-PCR wurden 10 ng Produkt der PCR 1 und 10 ng von Produkt der PCR 2 eingesetzt.

Tabelle 16: PCR-Programm zur Generierung der LEC-CARs

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	30	
Denaturierung	98	30	} 25-40x
Primerhybridisierung	55 bzw. 58*	30	
Elongation	72	**	
Finale Elongation	72	600	
Abkühlen	10	∞	

* Alle PCRs wurden bei 58 °C durchgeführt bis auf die Fusions-PCRs der LEC-CARs mit Linker bzw. mit Linker und Myc-Tag.

** Die Elongations-Zeit wurde an die DNA-Fragment-Länge angepasst. Die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase synthetisiert 1 kb / 30 s.

Die Produkte der Fusions-PCR bzw. der PCR der Einzelkonstrukte von den LEC-CARs ohne Linker und optionalen Myc-Tag wurden in den pJET 1.2/blunt-Vektor mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* nach Herstellerangaben subkloniert, gefolgt von einer Transformation in die chemisch kompetenten Bakterien JM109 (s. Abschnitt 2.2.1.6). Die Bakterien-Kolonien wurden am nächsten Tag mit einer Kolonie-PCR, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, auf das Vorhandensein des Inserts getestet. Mit den bestätigten Klonen wurde anschließend eine Plasmid-Isolation und Sequenzierung durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.7 und 2.2.1.8). Die DNA aus der Plasmid-Isolation diente gleichzeitig auch als Ausgangsprodukt bzw. Insert für die folgende Restriktion und Ligation in den folgenden Abschnitten.

Für die LEC-CARs mit Linker und optionalen Myc-Tag wurden die Produkte der PCR bzw. Fusions-PCR ohne Subklonierung für die Gel-Elektrophorese verwendet, anschließend aufgereinigt und als Ausgangsprodukt für den Restriktionsverdau verwendet, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der auf den Agarplatten gewachsenen Bakterien-Klone auf das Vorhandensein des Inserts (s. Abschnitt 2.2.1.6) wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde DNA gewonnen, indem ein Bakterien-Klon mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und anschließend in 10 µl ddH₂O gegeben und so lysiert wurde. Mit derselben Pipettenspitze wurde vor der Lyse eine weitere Agarplatte beimpft, um gegebenenfalls die entsprechenden Plasmide isolieren zu können (s. Abschnitt 2.2.1.7). Die verwendeten Primer FG33pBullet_pol_fw und FG34pBullet_hlgG_rev sind mit ihrer Sequenz in Anhang-Tabelle II im Anhang aufgeführt, Abbildung 6 zeigt die Lage der Primer im pBullet Vektor. Tabelle 17 zeigt die eingesetzten Reagenzien, Tabelle 18 fasst das PCR-Programm der Kolonie-PCR zusammen.

Tabelle 17: Volumina der eingesetzten Reagenzien für die Kolonie-PCR

PCR-Reagenz	Volumen [μ l]
ddH ₂ O-Bakterien-Gemisch	2
DreamTaq Green Master Mix (2x)	12,5
1 μ l FG33pBullet_pol_fw	1
1 μ l FG34pBullet_hlgG_rev	1
ddH ₂ O	8,5

Tabelle 18: Programm der Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	95	60
Denaturierung	95	20
Primerhybridisierung	55	30
Elongation	72	60
Finale Elongation	72	120
Abkühlen	4	∞

} 25x

Die PCR-Produkte wurden anschließend für eine Gel-Elektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.2) verwendet, um die Bakterienklone mit Insert von denen ohne Insert zu differenzieren.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung amplifizierter DNA erfolgte in Agarose-Gelen. Für ein 1%-Gel wurde 0,8 g Agarose-Pulver mit 80ml 1x TAE-Puffer gemischt und für 2-3 min unter gelegentlichen Schwenken in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde 3 μ l Ethidiumbromid, 8 μ l ROTI® *GelStain* oder 8 μ l *GeldRed*® zur Agaroselösung hinzugegeben, diese in den mit einem Kamm zur Aussparung von Geltaschen vorbereiteten Schlitten gegossen und Luftblasen entfernt. Sobald das Gel fest war, wurde der Gelschlitten in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben. Die DNA-Proben wurden, falls noch nicht im Ansatz vorhanden, mit 1x DNA *Loading Dye* versetzt und die Geltaschen damit beladen. Die *Gene Ruler* 100bp DNA-Leiter wurde als Größenstandard verwendet und 5 μ l davon in die äußerste Geltasche gegeben. Die Elektrophorese erfolgte anschließend für 120 Volt für 25-30 min. Danach wurde das Gel in einem UV-Transilluminator beleuchtet und fotografiert.

2.2.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und gewogen. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde das *QIAquick*® *PCR & Gel Cleanup Kit* verwendet und nach Herstellerangaben sowohl die Gel-Extraktion als auch eine anschließende PCR-Aufreinigung durchgeführt. Die DNA wurde in 30 μ l ddH₂O eluiert. Zum Schluss wurde die DNA-Konzentration am Spektrophotometer bestimmt.

2.2.1.4 Restriktionsverdau

Zur Vorbereitung der Ligation wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die Lage der Schnittstellen BamHI und NruI (synonym RruI) im γ -retroviralen pBullet Vektor ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die Restriktion des Vektors wurden 3 μ g DC-SIGN LEC-CAR pBullet EGFP Vektor, 2 μ l BamHI, 2 μ l NruI, 3 μ l 10x *Fast Digest Green Buffer* auf Eis gemischt und mit ddH₂O auf 30 μ l aufgefüllt. Für die Restriktion des Inserts (Lektindomänen) wurden 1 μ g aufgereinigtes PCR-Produkt, 1,5 μ l BamHI, 1,5 μ l NruI und 3 μ l 10x *Fast Digest Green Buffer* auf Eis gemischt und mit ddH₂O auf 30 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze für 1 Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert und danach sofort auf Eis abgestoppt. Anschließend wurde, wie in Abschnitt 2.2.1.2, eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Allerdings wurde jeweils nur ein kleiner Teil des Restriktionsverdaus auf dem Gel zur Höhenbestimmung der Banden mit UV-Licht beleuchtet und der restliche Teil des Restriktionsverdaus auf gleicher Höhe im unbelichteten Gelanteil herausgeschnitten, sodass die weiterverwendete DNA kein Kontakt zu UV-Licht hatte. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.3) und der linearisierte Vektor und das Insert anschließend für die Ligation verwendet.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation des Inserts mit dem pBullet Vektor wurden 100 ng des verdauten DC-SIGN LEC-CAR pBullet EGFP Vektors in einem molaren 1:3 bis 1:8 Vektor-zu-Insert-Verhältnis mit den verdauten Insert, 2 μ l 10x T4 DNA-Ligase Puffer und 1 μ l T4-Ligase zusammengegeben und mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Diese Reaktionsmischung wurde bei 16 °C über Nacht im Heizblock inkubiert. Am folgenden Tag wurden 4 μ l des Ligation-Ansatzes für die Transformation von Bakterien benutzt.

2.2.1.6 Transformation von Bakterien

Es wurden zwei verschiedene Bakterienstämme zur Transformation verwendet: *E. coli* TOP10 von Thermofisher und JM109 von Promega, die mit dem *Mix & Go! E.coli* Transformation Kit Zymo Research nach Herstellerangaben chemisch kompetent gemacht und anschließend in 75 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert wurden.

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 4 μ l des Ligation-Ansatzes hinzugegeben, geschwenkt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 s ein Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad durchgeführt und die Bakterien danach sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die

Bakterienkultur auf eine vorgewärmte Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.7 Plasmid isolation

Am Tag nach der Transformation wurden Bakterien-Einzelklone mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und damit eine Kolonie-PCR durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.1). Die in der Kolonie-PCR bestätigten gepickten Klone mit Insert wurden dann in 5 ml flüssigen LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) über Nacht bei 37 °C und Schütteln bei 175 rpm inkubiert. Für die Plasmid-Isolation (Minipräparation) wurde das *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* von Macherey-Nagel verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl ddH₂O eluiert und die Konzentration am Spektrophotometer bestimmt. Für höhere DNA-Konzentrationen (Maxipräparation) wurden 100 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) mit 150 µl der Minipräparation-Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und Schütteln bei 175 rpm inkubiert. Anschließend wurde das *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* zur Plasmid isolation verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in 500 µl ddH₂O eluiert und die Konzentration am Spektrophotometer bestimmt.

2.2.1.8 Sequenzierung

Die Plasmid-DNA aus der Minipräparation wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf ihre Korrektheit der inserierten DNA-Fragmente (Lektin-Domänen) überprüft. Dafür wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 3 µl Sequenzierungsprimer (10 µM) gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung erfolgte über Microsynth SeqLab GmbH in Göttingen, Deutschland.

Nach Abschluss der Klonierung wurden aus der Maxipräparation-DNA alle LEC-CAR-Konstrukte im pBullet Vektor (Tabelle 13) vom Signal-Peptid bis zum GFP mit verschiedenen Sequenzierprimern überprüft. Die Primer zur Sequenzierung sind in Anhang-Tabelle II im Anhang aufgeführt und in Abbildung 6 in ihrer Position im pBullet Vektor dargestellt.

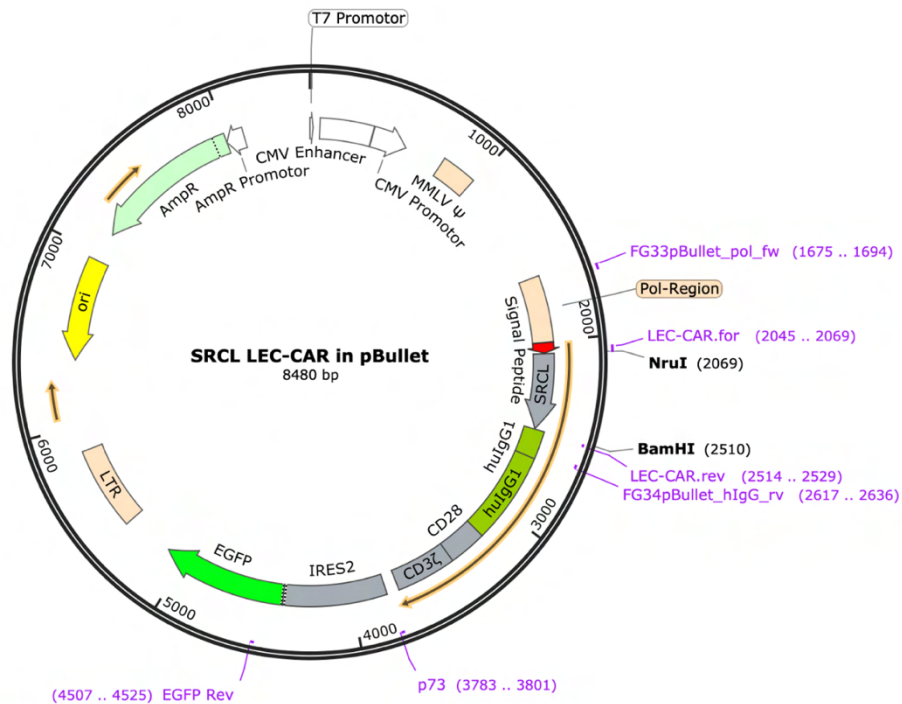


Abbildung 6 Lage der zur Sequenzierung verwendeten Primer im γ -retroviralen pBullet Vektor. Mithilfe der Vorwärts-Primer FG33pBullet_pol_fw, LEC-CAR.for und den Rückwärts-Primer LEC-CAR.rev, FG34pBullet_hlgG_rv, p73 und EGFP Rev konnte das gesamte CAR-Konstrukt vom Signalpeptid bis zum Expressionsreporter GFP auf die Korrektheit der DNA mittels Sanger-Sequenzierung überprüft werden. Beispielhaft ist hier der SRCL LEC-CAR in pBullet gezeigt. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (GGSG)3 = Glycin-Serin-Linker, hulgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, AmpR = Ampicillin-Resistenzgen, CMV = Cytomegalievirus, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*

2.2.2 Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Arbeiten mit den Zelllinien (Tabelle 19) wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kulturmedien (Tabelle 20) wurden vor Gebrauch auf 37 °C temperiert. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5% CO₂-Begasung. Es wurden verschieden große sterile, beschichtete Zellkulturflaschen und -platten zur Kultivierung der Zelllinien verwendet. Kleine Flaschen hatten eine Fläche von 25 cm² (T25), mittlere Flaschen eine Fläche von 75 cm² (T75) und große Flaschen eine Fläche von 175 cm² (T175). Bei der 6-Well-Platte betrug die Fläche circa (ca.) 10 cm² pro Vertiefung.

Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen regelmäßig in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 geteilt. Um adhärent wachsende Zellen aus der Kulturflasche abzulösen, wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen und nach Zugabe von Trypsin/EDTA für zwei bis fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch

Zugabe von Medium abgestoppt und die Zellen durch zusätzliches mechanisches Auf- und Abpipettieren abgelöst.

Tabelle 19: Kultivierte humane Zelllinien und deren Verfügbarkeit

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HEK293T	humane embryonale Nierenzelllinie, epitheliale Morphologie; adhärenzte Zelllinie	Bestand AG Müller, Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg; ATCC (CRL-3216™)
HL-60	humane Leukämiezelllinie, Promyeloblasten aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit akuter promyelozytärer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); ATCC (CCL-240™)
K562	humane Leukämiezelllinie, Lymphoblasten aus dem Knochenmark eines 53-jährigen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	Bestand AG Müller, Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg; ATCC (CCL-243™)
Kasumi-1	humane Leukämiezelllinie, Myeloblasten aus dem peripheren Blut eines sieben Wochen alten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); ATCC (CRL-2724™)
KPL-1	humane Brustkrebszelllinie (Östrogenrezeptor positiv), Brustkrebszellen aus der Pleuraflüssigkeit einer 50-jährigen Frau, Kreuzkontamination mit der Brustkrebszelllinie MCF-7; adhärenzte Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher (Hamburg); DMSZ (ACC 317)
Molm13	humane Leukämiezelllinie, akute myeloische Leukämiezellen aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Patienten; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); DSMZ (ACC 554)
MV4-11	humane Leukämiezelllinie, Makrophagen aus dem peripheren Blut eines 10-jährigen Patienten mit B-myelomonozytärer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); ATCC (CRL-9591™)
NK92	humane NK-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, IL-2 abhängig; Suspensions-Zelllinie	ATCC (CRL-2407™)

OCI-AML3	humane Leukämiezelllinie, akute myeloische Leukämiezellen aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Patienten; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); DMSZ (ACC 582)
OCI-M1	humane Leukämiezelllinie, Erythroblasten eines 62-jährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); DMSZ (ACC 529)
THP-1	humane Leukämiezelllinie, Monozyten aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monozytärer Leukämie; Suspensions-Zelllinie	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jasmin Wellbrock (Hamburg); ATCC (TIB-202™)

Die Zelllinien wurden in Kulturmedien mit folgenden Zusätzen kultiviert:

Tabelle 20: Medien und ihre Zusammensetzung

Mediumname	Basismedium	Zusätze	Verwendung
DMEM-Vollmedium	DMEM	10% FKS (h.i.) 1% Pen/Strep	Kultivierung von HEK293T und KPL-1
NK92-Medium	MEM, alpha-Modifikation	12,5% FKS (h.i.) 12,5% Pferdserum (h.i.) 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Kultivierung von NK92
RPMI-Vollmedium	RPMI	10% FKS (h.i.) 1% Pen/Strep	Kultivierung der Leukämiezelllinien OCI-AML3, OCI-M1, Molm13, Kasumi-1, THP-1, MV4-11, HL-60, K562

FKS und Pferdserum wurden vor Zugabe ins Medium bei 56 °C für 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Die Zentrifugation von Zellen erfolgte standardmäßig, wenn nicht anders angegeben, bei 300 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT).

2.2.2.2 Isolation und Kultivierung von primären Zellen

Gesundes peripheres Blut (Restmaterial von anonymen Blutspenden) wurde mittels Erylyse für durchflusszytometrische Untersuchungen vorbereitet. Dafür wurden die zehnfache Menge an 1x ACK-Lysepuffer (10x ACK-Lysepuffer mit ddH₂O verdünnt) zum Blut

hinzugegeben. Nach Inkubation von 10 min bei 4°C und gelegentlichen Schwenken wurde das Blut für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellsediment wurde zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 300 x g). Nach Resuspension in PBS konnten die Zellen anschließend für durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen weiterverwendet werden (s. Abschnitt 2.2.2.8).

Gesundes Knochenmark (Restmaterial von Knochenmarkpunktionen, Ethikvotum: PV7323) wurde zunächst in RPMI-Vollmedium gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min). Anschließend wurde ebenfalls eine Erylyse mit der zehnfachen Menge an 1x ACK-Lysepuffer oder *BD Pharm Lyse™ Lysing buffer* (ebenfalls 1:10 in ddH₂O verdünnt), wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI-Vollmedium resuspendiert und für durchflusszytometrische Färbungen weiterverwendet. Die Isolation von peripheren Blutzellen und Knochenmark ist publiziert in Prasse et al., 2024.

Primäre pädiatrische Leukämieproben aus Knochenmark oder peripheren Blut (Ethikvotum: PV4296) wurden zunächst über Nacht in RPMI-Vollmedium bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde, wie zuvor beschrieben, nach Zentrifugation bei 300 x g für 5 min eine Erylyse mit dem ACK-Lysepuffer durchgeführt. Nach Resuspension in RPMI-Vollmedium wurden die Leukämiezellen bei 37°C kultiviert oder direkt für durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen weiterverwendet.

Primäre adulte Leukämieproben aus Knochenmark oder peripheren Blut (Ethikvotum: PV3469) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler und PD Dr. Wellbrock (Hamburg) bereitgestellt und waren jeweils bereits durch Dichtegradientenzentrifugation aufbereitet und in Kultur genommen. Nach Kultivierung bei 37°C über Nacht wurden die Leukämiezellen geerntet, in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min) und in RPMI-Vollmedium resuspendiert. Anschließend konnten auch diese Zellen für durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen weiterverwendet werden.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden adhärente Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA gelöst, Zellen in Suspension wurden resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde dann in 0,5 ml des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert, zusätzlich mit 0,5 ml FKS mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zügig bei 37 °C im Wasserbad unter ständigem Schwenken angetaut und anschließend direkt in 10 ml entsprechenden warmen Kulturmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment erneut in Medium aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und diese im Inkubator kultiviert.

2.2.2.4 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauerkammer verwendet. Die zu zählenden Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau vermischt. Davon wurden 10 µl an den Rand des Deckglases pipettiert, sodass sich die Zellsuspension durch Kapillarkräfte darunter verteilte. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nicht membrangängig ist und damit nur tote Zellen aufgrund deren Membrandefekte blau anfärbt. Lebende Zellen erscheinen daher unter dem Mikroskop hell, rund und ungefärbt und nur diese Zellen werden gezählt.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte entweder mit der Neubauerkammer im Zellzählgerät Countess 3 automatisch oder unter dem Mikroskop. Im letzteren Fall wurden alle vier Eckquadranten ausgezählt und der Mittelwert daraus gebildet. Die Zellkonzentration wurde dann mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Summe aus den Zellzahlen aller 4 Eckquadranten}}{4} \times 10.000 \times 2$$

2.2.2.5 Retrovirusproduktion

Für die Produktion viraler Partikel wurden HEK293T-Zellen mit dem γ-retroviralen pBullet Plasmid und den Plasmiden pHCMV-GALV (kodiert die Hülle) und pcDNA3.MLV.gp (Gag/Pol) mittels Lipofectamine3000 transient transfiziert.

Dafür wurden die HEK-Zellen nach Ablösen mit Trypsin/EDTA zunächst geerntet, in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min) und mit je $1,2 \times 10^6$ Zellen in 2 ml DMEM-Vollmedium pro CAR-Konstrukt in die Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Konfluenz betrug am darauffolgenden Tag der Transfektion 95-99%. Die Transfektion wurde mit dem *Lipofectamine® 3000 Transfection Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusammenfassend wurden pro CAR-Konstrukt zwei Ansätze gemischt: In einem ersten Ansatz wurden 250 µl Opti-MEM mit 7 µl Lipofectamine3000 gemischt. Im zweiten Ansatz wurden 250 µl Opti-MEM, 6 µl P3000 und 1,7 µg pcDNA3.MLV.gp sowie 0,5 µg pHCM-GALV und 1,7 µg LEC-CAR Vektor zusammengegeben. Beide Ansätze wurden nach 2-5 Minuten gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den HEK-Zellen aus der 6-Well-Platte abgesaugt und 2 ml DMEM mit 10% FKS neu hinzugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500 µl des Transfektionsansatzes tröpfchenweise gleichförmig auf den Zellen verteilt und diese für 48-72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die Transfektion am Fluoreszenzmikroskop überprüft, da die HEK-Zellen nach erfolgreicher Transfektion auch GFP produzieren.

2.2.2.6 Virale Transduktion

Zur Vorbereitung der NK92-Zellen auf die Transduktion wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen, zentrifugiert und in NK92-Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden je $0,25 \times 10^6$ NK92-Zellen in die Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. 48-72 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand mit den viralen Partikeln von den transfizierten HEK-Zellen abgenommen, zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Dieser wurde dann zur Erhöhung der Transduktionseffizienz mit Polybren (1:1000) versetzt und invertiert. Der jeweilige Überstand wurde dann direkt auf die zu transduzierenden NK92-Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und in NK92-Vollmedium aufgenommen und in einer T25-Zellkulturflasche kultiviert.

Die Transduktionseffizienz wurde nach einer Woche durchflusszytometrisch über die GFP-Expression bestimmt. Dafür wurden die NK92-Zellen geerntet, in PBS gewaschen, zentrifugiert und in PBS mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

2.2.2.7 Zellsortierung

Die NK92-Zellen wurden 5-7 Tage nach der Transduktion im FACS Aria™ *Fusion Cell Sorter* über eine Selektion der GFP-positiven Zellen sortiert. Die Sortierung wurde in der FACS Core Facility am Leibniz-Institut für Virologie (Hamburg) durch Diplom-Ingenieur für Biotechnologie (FH) Arne Düsedau durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen geerntet und mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer (2% FKS) resuspendiert und zur Vereinzelung durch ein Zellsieb in FACS-Röhrchen gegeben. Nach der Sortierung wurden die Zellen gewaschen und in Abhängigkeit von der Zellzahl in 100 – 1000 µl NK92-Vollmedium in Kultur genommen und weiter kultiviert.

2.2.2.8 Durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am BD FACSCanto™ oder MacsQuant10 (Miltenyi) durchgeführt. Vor jeder Messung bzw. einmal täglich wurde eine Kalibrierung mit *CS&T Beads* (Becton Dickinson) bzw. den *Calibration Beads* (Miltenyi) durchgeführt. Für die anschließende Auswertung wurde das Programm FlowJo verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde die zu analysierende Zellpopulation in der Auswertung im FSC und SSC eingegrenzt und für weitere Analysen verwendet.

Falls eine Kompensation notwendig war, wurde diese nach Herstellerangaben mit den BD *CompBeads* durchgeführt. Falls dies nicht möglich war, wurden Zellen mit dem entsprechenden Fluorophor angefärbt und kurz vor der durchflusszytometrischen Messung mit ungefärbten Zellen gemischt. Die Kompensation wurde anschließend mit dem Programm FlowJo durchgeführt.

Glykosylierungsanalyse von Zellen

Für die Untersuchung der Oberflächenglykosylierung von Zelllinien, primären Leukämieproben, gesunden Knochenmark und peripheren Blut wurden rekombinante humane Lektine verwendet. Je 150 µl Zellkulturüberstand stabil transfizierter HEK293-T-Zellen, die CD301 und SRCL als rekombinante Proteine mit einem Myc-Tag sezernieren (von Dr. Anna-Katharina Franke zur Verfügung gestellt), wurden mit 3 µl biotinylierten Anti-Myc-Antikörper über Nacht bei 4° C und anschließend mit 0,4 µl fluoreszierendem Streptavidin (RPE) im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 150 µl DMEM-Vollmedium und 3 µl biotinylierter Anti-Myc-Antikörper und 0,4 µl fluoreszierendem Streptavidin verwendet (Franke et al. 2023, Prasse et al. 2024).

Die kommerziell erworbenen rekombinanten, humanen Proteine DC-SIGN und die Siglecs besitzen einen FC-Tag und 1 µg Protein in 100 µl PBS wurde mit 1 µg fluoreszierenden anti-FC-Antikörper (RPE) für eine Stunde im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente 100 µl PBS mit 1 µg fluoreszierenden anti-FC-Antikörper.

Die primären Leukämieproben sowie das gesunde Knochenmark und periphere Blut wurden mittels Erylyse oder Ficoll aufbereitet (s. Abschnitt 2.2.2.2), in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min) und je 1 x 10⁶ Zellen in 100 µl RPMI-Vollmedium resuspendiert. Die Zelllinien wurden ebenfalls geerntet, in PBS gewaschen und je 1 x 10⁶ Zellen in 100 µl RPMI-Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die vorbereiteten Lektine zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei 4° C gefärbt. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurde zusätzlich je 3 µl FC-Block hinzugegeben. Da die C-Typ-Lektine CD301, SRCL und DC-SIGN Ca²⁺-abhängig binden, wurden noch 0,1 µl CaCl₂ [1M] und 0,1 µl MgCl₂ [1M] hinzugefügt. Bei der Glykosylierungsanalyse von Knochenmarkszellen wurden nach 45 min Inkubation zur Differenzierung der Stammzellen je 1 µl CD34 (FITC)- und CD38 (Pe/Cy7)-Antikörper zu den Proben gegeben. Als Kontrolle für die unspezifische Bindung der Antikörper wurden die Proben parallel mit den entsprechenden Isotypen gefärbt. Teile dieser Analysen sind publiziert in Prasse et al., 2024.

C-Typ-Lektinproben wurden anschließend mit C-Typ-Lektin-Waschpuffer gewaschen. Für die übrigen Proben wurde PBS verwendet. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse. Aufgetaute Leukämieproben wurden 10 Minuten vor der FACS-Analyse zusätzlich mit 5 µl Lebend-Tot-Farbstoff 7-AAD im Dunkeln und auf Eis angefärbt.

Im Folgenden ist die Gating-Strategie der verschiedenen Zellpopulationen gezeigt: gesundes peripheres Blut (Abbildung 7), gesundes Knochenmark (Abbildung 8), frische

versus gefrorene Leukämieproben (Abbildung 9). Bei den frischen Leukämieproben und Zelllinien wurde die Zellpopulation mit dem Vorwärts-Streulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärts-Streulicht (*side scatter*, SSC) eingegrenzt.

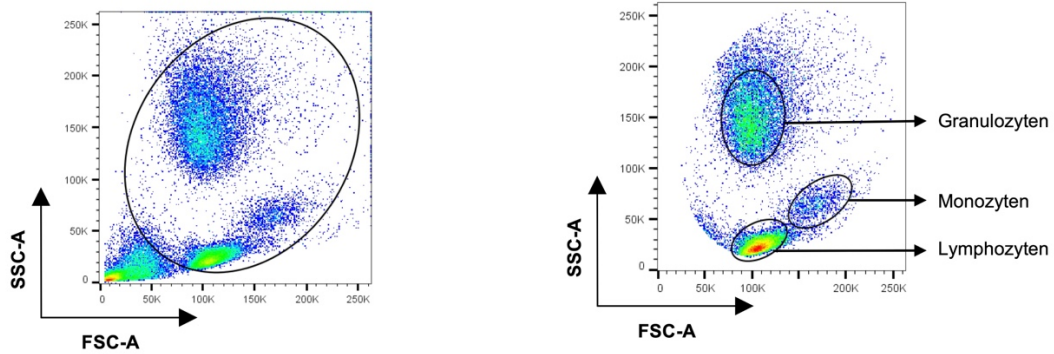


Abbildung 7 Gating-Strategie von peripherem Blut zur Identifizierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Mit dem FSC und SSC wurde zunächst der Zelldebris ausgeschossen. Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen eingegrenzt: Lymphozyten (unten links), Monozyten (in der Mitte rechts) und Granulozyten (oben). Beispielhaft ist das Gating eines von insgesamt sieben Spenders gezeigt. Abbildung: Adaptiert nach Prasse et al., 2024.

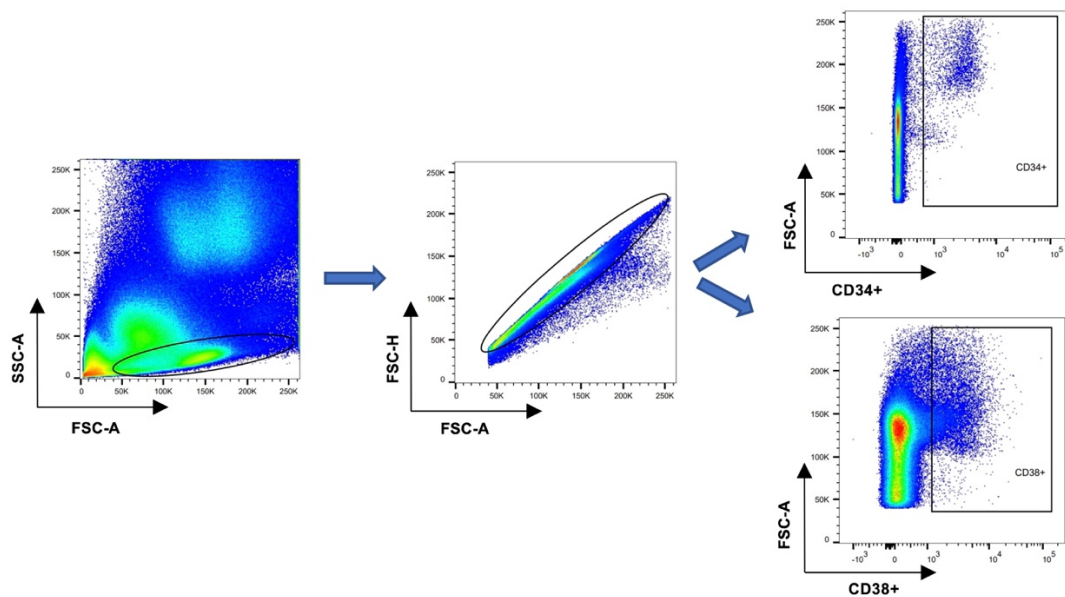


Abbildung 8 Gating-Strategie von Knochenmark zur Identifizierung der CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen. Mit dem FSC und SSC wurde die Population der Stammzellen eingegrenzt. Zum Ausschluss von Zelldubletten wurde der FSC-H und FSC-A angewandt. Durch die Expression von CD34 und CD38 konnte die Stammzellen identifiziert werden. Beispielhaft ist das Gating eines von insgesamt drei Spenders gezeigt. Teile dieser Daten wurden publiziert in Prasse et al., 2024.

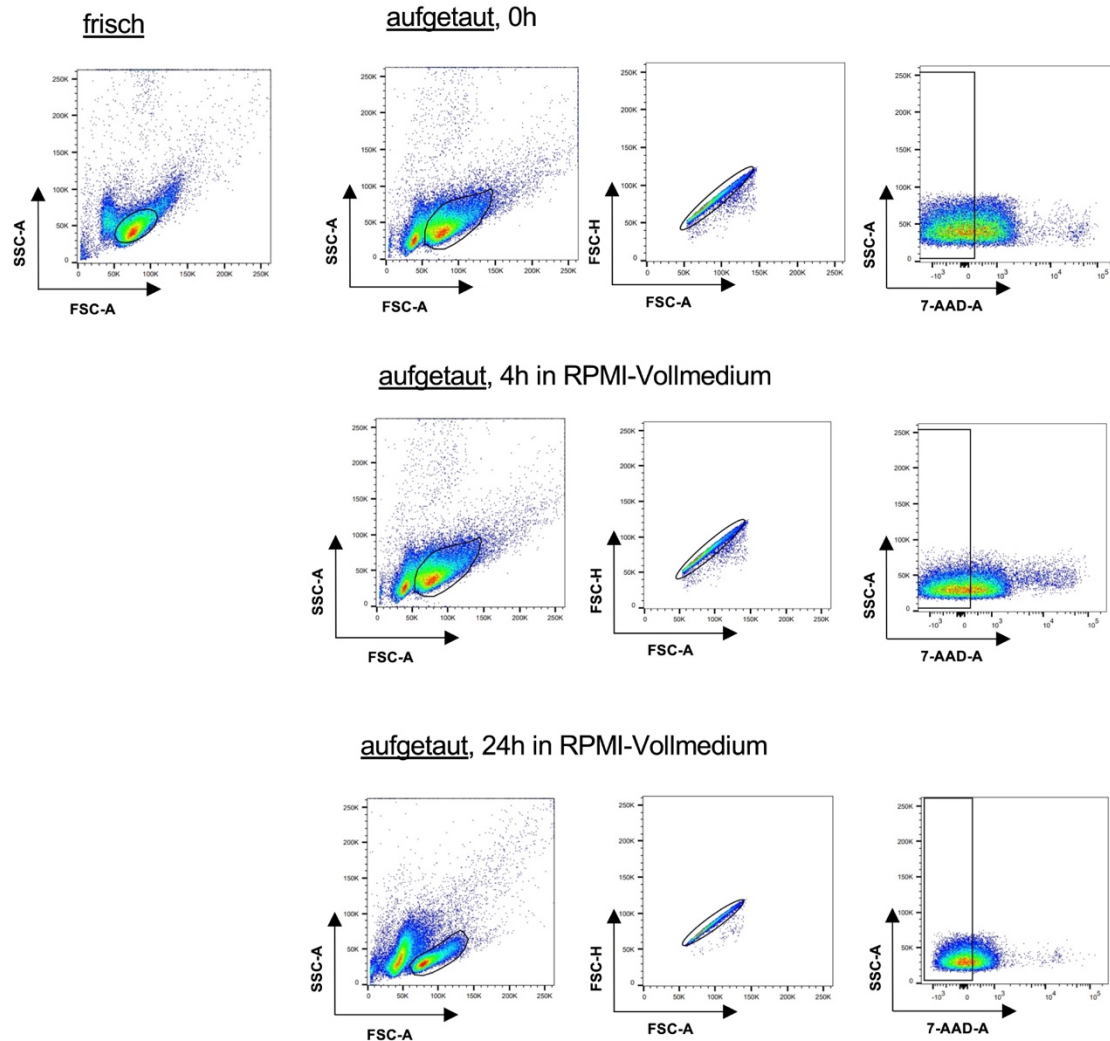


Abbildung 9 Gating-Strategie von primären Leukämiezellen, frisch und aufgetaut nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen. Die Leukämieprobe wurde im frischen Zustand durchflusszytometrisch untersucht und die Zellpopulation im FSC und SSC eingegrenzt. Ein Teil der Probe wurde mit 10% DMSO in FKS eingefroren und wieder aufgetaut, anschließend direkt oder nach vier bzw. 24 Stunden Kultivierung in RPMI (mit 10% FKS) durchflusszytometrisch untersucht. Für die aufgetauten Proben wurde zusätzlich der Lebend-Tot-Farbstoff 7-AAD verwendet, um tote Zellen ausschließen zu können. Dargestellt ist die Gating-Strategie einer primären Leukämieprobe von insgesamt zwei unabhängigen Probenanalysen.
h = Stunden

Detektion der CAR-Konstrukte auf der Oberfläche transduzierter NK92-Zellen

Einige der in dieser Arbeit klonierten CAR-Konstrukte enthielten einen Myc-Tag, um die Detektion der CARs auf der Oberfläche zu ermöglichen. Für den Nachweis des Myc-Tags der LEC-CARs wurden die NK92-Zellen geerntet, in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min), in 100 µl resuspendiert und anschließend für eine Stunde bei 4°C mit 1 µl Anti-Myc-Antikörper (AlexaFluor647) inkubiert. Nach Waschen der Zellen in PBS (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min) wurden diese im FACS analysiert.

Für den Oberflächennachweis der Siglec7-Domäne in den LEC-CARs wurde 1 µg biotinylierter anti-Siglec7-Antikörper oder 1 µg vom dazugehörigen Isotypen mit je 0,5 µl

fluoreszierenden Streptavidin (Alexa647) für eine Stunde im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die geernteten und mit PBS gewaschenen NK92-Zellen für eine Stunde bei 4 °C gegeben. Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Glykanspezifität der LEC-CARS mit Fluoreszenz-markierten Glykanen

Zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre Glykanliganden wurden die synthetischen Oligosaccharide Lewis X, (Neu5Ac α)3-C3 ((Sia)₃) und 6'Sialyl-N-acetyllactosamine (6'SLN) verwendet, die an ein mit Biotin markierten Polyacrylamid-Rückgrat (PAA) gebunden sind. Diese Glykokonjugate wurden mit Fluoreszenz-markiertem Streptavidin komplexiert. Hierfür wurde ein molares Streptavidin-Biotin-Verhältnis von eins zu vier angestrebt, damit alle vier Bindungsstellen des Streptavidins belegt sind. Dafür wurden 1,64 µg biotinylierte Glykokonjugate in 100 µl PBS mit 1 µg fluoreszierenden Streptavidin (Alexa647) für zwei Stunden im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diese auf die geernteten und in PBS gewaschenen LEC-CAR tragenden NK92-Zellen gegeben (je 1 x 10⁵ Zellen pro Kohlenhydratligand) und in Anwesenheit von 1mM CaCl₂ [1M] und 1 mM MgCl₂ [1M] für eine Stunde bei 4° C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PBS bzw. die LEC-CARs mit SRCL mit dem C-Typ-Lektin-Waschpuffer gewaschen und im FACS untersucht.

2.2.3 Immunologische Methoden/Funktionalitäts-Tests

2.2.3.1 Zytotoxizitäts-Test (Calcein-basiert)

Die zytotoxische Aktivität der LEC-CAR exprimierenden NK92 gegenüber den Leukämiezelllinien wurde in einem Calcein-basierten Messverfahren getestet. Die Zielzellen werden dabei mit zellpermeablen Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) gefärbt. In allen lebenden Zellen wird dieses intrazellulär durch Esterasen in grün fluoreszierendes und hydrophiles Calcein umgewandelt. Sterbende und tote Zellen geben das Calcein ins Medium ab. Die Fluoreszenzintensität des Calceins im Überstand ist damit direkt proportional zum Anteil getöteter Zellen.

Für die Färbung der Zielzellen wurden die Leukämiezelllinien bzw. die adhärente Zelllinie KPL-1 nach Ablösung mit Trypsin/EDTA geerntet. Nach zweifachem Waschen mit PBS (Zentrifugation bei 300 x g, 5 min) wurden die Zellen in 10 µg Calcein-AM (in 1 ml PBS) bei 37 °C für 35 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von RPMI-Vollmedium abgestoppt, die Zellen zentrifugiert, in RPMI-Vollmedium resuspendiert und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in RPMI ohne FKS resuspendiert und 1 - 1,5 x 10⁴ Zellen in 100 µl pro Vertiefung in eine transparente 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät.

Die NK92-Zellen als Effektorzellen wurden 48 Stunden und 24 Stunden vorher mit 150 U/ml IL-2 in NK92-Medium vorstimuliert. Nachdem die NK92 geerntet und zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 5 min) wurden, wurden sie mit den Zielzellen im Verhältnis von 1:1 bis 10:1 in der 96-Well-Rundbodenplatte gemischt. Einige Wells wurden nur mit den Calcein-behandelten Zielzellen inkubiert, um die Spontan-Lyse zu messen. Um festzustellen, wie hoch die Maximal-Lyse der Zielzellen ausfällt, wurden die Zielzellen mit 1% Triton X-100 behandelt.

Anschließend wurden die Platten für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Platten für 10 min bei 100 x g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes in eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte überführt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 520 nm im Plattenreader bestimmt.

Für die Berechnung der prozentualen spezifischen Lyse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = 100 \times \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}}$$

2.2.3.2 MTT-Test

Der MTT-Test (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität und Vitalität von Zellen. Dadurch kann überprüft werden, ob im Zytotoxizitäts-Test vergleichbare Zellzahlen von Effektor- und Zielzellen in den verschiedenen Ratios eingesetzt wurden. Zur Durchführung des MTT-Tests wurde der *CellTiter 96® Non-radioactive Cell Proliferation Assay* benutzt. Das Reagenz enthält das gelbe, membrangängige Tetrazoliumsalz MTT, das von lebenden Zellen in ein blaues Formazanprodukt umgesetzt wird, welches photometrisch gemessen werden kann.

Der MTT-Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden in 100 µl Medium mit gleicher Zellzahl wie im Zytotoxizitäts-Test in eine transparente 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät und 15 µl der MTT-Färbelösung pro Vertiefung hinzugeben. Die Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Stop-Lösung hinzugeben, um das Formazan zu lösen. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation bei 37 °C und Resuspension wurde die Absorption bei 570 nm im Plattenreader gemessen.

2.2.3.3 Degranulations-Test

Die Oberflächenexpression von CD107a (synonym Lysosomal-assoziiertes Membranprotein-1, LAMP-1) ist ein Marker der zytotoxischen Degranulation von Immunzellen. Die NK92-Zellen wurden 24 Stunden vorher resuspendiert und mit 150 U/ml IL-2 in NK92-Medium vorstimuliert. Die NK92-Zellen und die Zielzellen wurden geerntet (bei adhärennten Zielzellen nach Ablösen mit Trypsin/EDTA) und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 5 min). Nach Resuspension in RPMI-Vollmedium wurden

8×10^4 NK92-Zellen in 100 μ l pro Vertiefung in eine transparente 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät.

Für die Bestimmung der spontanen Degranulation wurde die CD107a-Expression auf unstimulierten NK92-Zellen gemessen. Als Positivkontrolle dienten NK-Zellen, die mit 2,5 μ g/ml PMA (2-Methoxy-1-methylacetat) und 0,5 μ g/ml Ionomycin behandelt wurden. Die Zielzellen wurden mit 8×10^4 Zellen in 100 μ l RPMI-Vollmedium für ein Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen von 1:1 zu den NK92-Zellen gegeben. Für die Bestimmung der Degranulation gegenüber den Zielzellen wurden die NK92-Zellen mit 1 μ l CD107a-Antikörper pro Vertiefung gefärbt. Anschließend wurde die Platte bei 100 x g für 1 min zentrifugiert und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte mit 100 μ l PBS pro Vertiefung gewaschen. Danach wurde der CD56-Antikörper (1:100 in PBS) zur Anfärbung der NK92-Zellen hinzugeben und die Platte für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit 100 μ l PBS pro Vertiefung gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g für 5 min) und die Zellen mit 1% PFA in PBS fixiert. Die Platte wurde durchflusszytometrisch am MacsQuant10 analysiert. Diese Methode ist publiziert in Franke et al., 2023.

Das Gating auf die CD56- und CD107a-positiven NK92-Zellen ist in Abbildung 10 dargestellt.

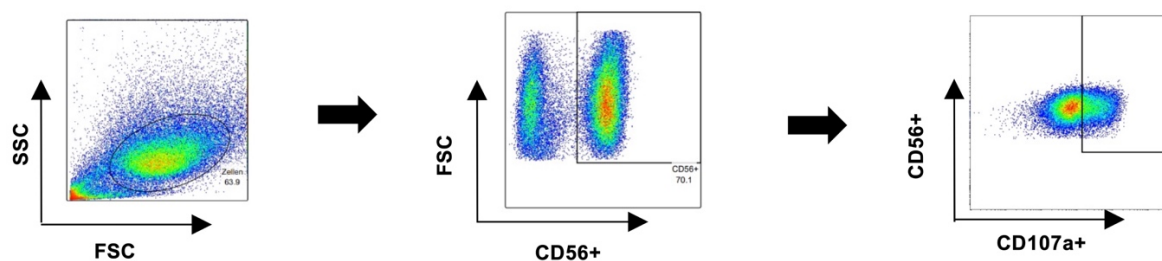


Abbildung 10 Gating-Strategie zur Identifizierung der CD56⁺ und CD107a⁺ NK92-Zellen im Degranulations-Test. Mit dem FSC und SSC wurde die Zellpopulation eingegrenzt. Durch die Expression von CD56 wurden die NK92-Zellen von den Zielzellen unterschieden. Innerhalb dieser Population konnte anschließend der Anteil der CD107a-positiven NK92-Zellen bestimmt werden. Gezeigt ist das Gating eines von zwei Degranulations-Tests.

2.2.3.4 Enzymgekoppelter Immunadsorptions-Test (IFN γ)

Zur Bestimmung der Produktion von Interferon gamma (IFN γ) der NK92-Zellen nach Inkubation mit den Zielzellen wurde das Reaktions-Kit *Human IFN gamma Uncoated ELISA* von Thermofisher Scientific verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die NK92-Zellen wurden am Vortag resuspendiert und mit 150 U/ml IL-2 in NK92-Medium vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und gezählt. Je 1×10^5 NK-Zellen und Zielzellen wurden für ein Verhältnis von 1:1 in 100 μ l RPMI-Vollmedium in

eine transparente 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät und für 22 Stunden bei 37° C inkubiert. NK92-Zellen ohne Zielzellen, die mit 40 ng/ml PMA bzw. 4 ng/ml Ionomycin behandelt wurden, und unbehandelte NK92-Zellen dienten als Kontrollen der maximalen und minimalen Zytokinfreisetzung. Am nächsten Tag wurde die Platte zentrifugiert (100 x g für 10 min), je 80 µl Überstand pro Vertiefung abgenommen und für die Durchführung des ELISAs verwendet. Anschließend wurde die ELISA-Platte im Plattenreader bei einer Absorption von 450nm vermessen.

2.2.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit einem ungepaarten T-Test durchgeführt (GraphPad Prism, Version 9.3.1). Horizontale Balken stellen Mittelwerte dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Ein p-Wert < 0,05 (*), p-Wert < 0,01 (**), p-Wert < 0,001 (***) und p-Wert < 0,0001 (****) wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Im folgenden Ergebnis-Teil ist in Abschnitt 3.4 in einigen Abbildungen je ein repräsentatives Experiment von mehreren unabhängigen Versuchsdurchführungen gezeigt. Die Darstellung der dazugehörigen Versuchsreplikate ist im Anhang zu finden. Die Gating-Strategien bei durchflusszytometrischen Untersuchungen sind im Methoden-Teil in Abschnitt 2.2.2.8 und 2.2.3.3 beschrieben.

3.1 Untersuchung der Oberflächenglykosylierung mit rekombinanten humanen Lektinen

Zuerst wurde die Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen untersucht. Ziel war es, einen Überblick über das Glykosylierungsprofil von Leukämiezellen zu bekommen und daraufhin die vielversprechendsten Lektine für die Generierung der Fusions-LEC-CARs auszuwählen. Im Vergleich wurde zusätzlich das Glykosylierungsprofil von peripheren Blutzellen und hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender untersucht, um eine Überschneidung der potentiellen Glykan-Zielstrukturen einer CAR-T-Zelltherapie mit gesunden Zellen und einer damit einhergehenden Hämatotoxizität zu berücksichtigen. Dafür wurden die entsprechenden Zellen mit PE-markierten, rekombinanten humanen Lektinen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

3.1.1 Vorarbeiten zur Oberflächenglykosylierung von Leukämiezelllinien

Sieben unterschiedliche Leukämiezelllinien wurden in Vorarbeiten bereits von Dr. Anna-Katharina Franke durchflusszytometrisch auf ihre spezifische Glykanstrukturen hin untersucht (Abbildung 11). DC-SIGN konnte auf allen Leukämiezelllinien binden, mit einer geringeren Bindung an OCI-M1. SRCL war auf HL-60, Molm13 und OCI-AML3 stark positiv und etwas schwächer auch auf Kasumi-1, MV4-11 und THP-1. Siglec2 und Siglec4a zeigten keine oder nur eine geringe Bindung. Siglec3 und Siglec5 konnten an keine der Leukämiezelllinien binden. Siglec7 und Siglec9 waren auf allen Zellen bis auf keine bzw. geringe Bindung an HL-60 auf allen Zellen positiv. Mit Siglec10 konnten ebenfalls, bis auf HL-60, alle Zelllinien mit mittlerer Intensität angefärbt werden.

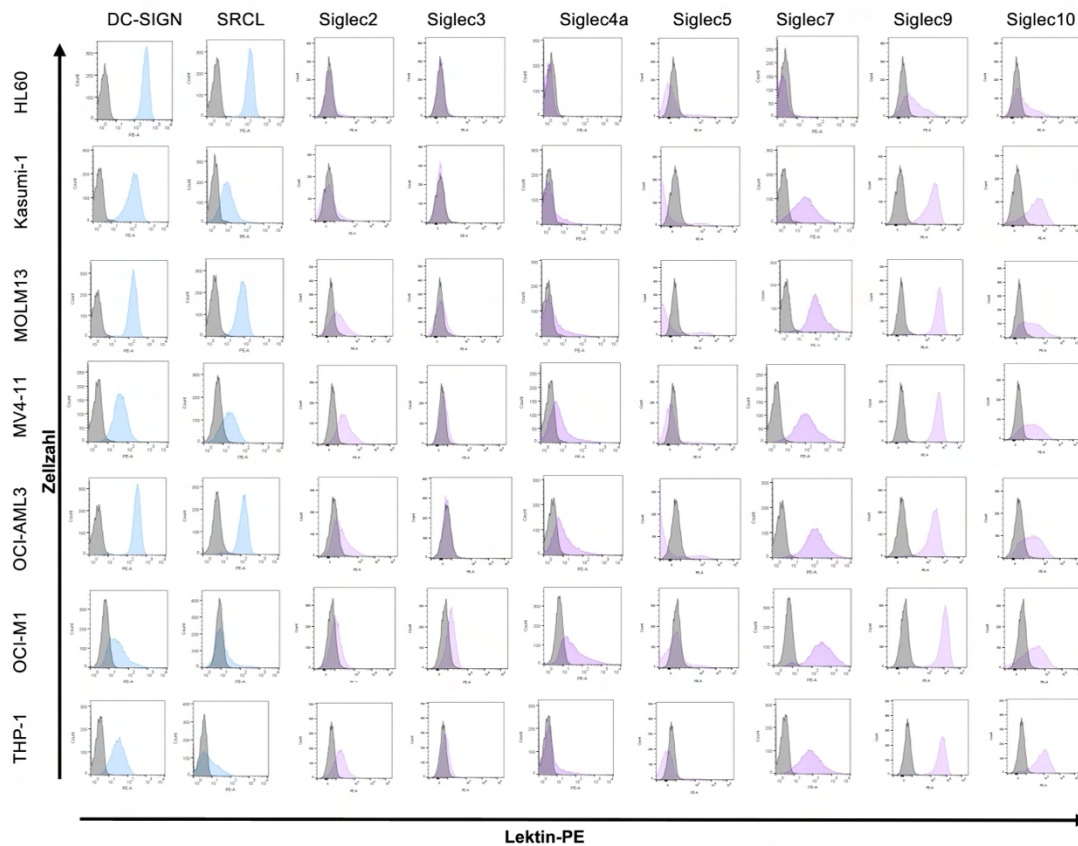


Abbildung 11 Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf Leukämiezelllinien. Sieben unterschiedliche Leukämiezelllinien wurden durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenglykosylierung hin untersucht. Gezeigt ist die Bindung der unterschiedlichen Fluorophor-markierten humanen Lektine an die Zelloberfläche (grau: Negativkontrolle, hellblau: C-Typ-Lektinbindung, lila: Siglec-Bindung). Die FACS-Analyse wurde von Dr. Anna-Katharina Franke durchgeführt und ausgewertet.

3.1.2 Verlust der Oberflächenglykosylierung von primären Leukämieproben im aufgetauten Zustand

Im Folgenden wurden analog zu den Zelllinien nun primäre pädiatrische Leukämieproben mit rekombinanten Lektinen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund niedriger Fallzahlen im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Zeitraum dieser Doktorarbeit wurde zusätzlich auch auf eingefrorene primäre Proben (in FKS mit 10% DMSO) zurückgegriffen. In der Analyse von gefrorenen Proben wurden tote Zellen nach dem Auftauprozess mittels einer zusätzlichen 7-AAD Färbung ausgeschlossen. Auf aufgetauten Proben schien die Färbeintensität von Siglec7, Siglec9 und Siglec10 deutlich geringer zu sein (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte bei diesen Proben das Bindeverhalten der Lektine im frischen Probenzustand rückwirkend nicht untersucht werden. Um die Hypothese des Verlusts der Oberflächenglykosylierung im aufgetauten Zustand im direkten Vergleich zu überprüfen, wurde dieselbe Probe im frischen Zustand sowie nach dem Einfrieren und Auftauen gefärbt. Des Weiteren wurden die Zellen auch nach einer Kultivierung von vier und 24 Stunden bei 37 Grad nach dem Auftauen untersucht, um zu überprüfen, ob sich die entsprechenden Glykanstrukturen wieder auf der

Oberfläche rekonstituieren (Abbildung 12). Passend zu der vorherigen Beobachtung zeigte sich auch hier, dass bei Siglec7, Siglec9 und Siglec10 die Bindung nach dem Auftauen deutlich geringer ausgeprägt und auch die Kultivierung nach dem Auftauen die Glykanstrukturen auf der Oberfläche nicht mehr vollständig regenerieren konnten.

A

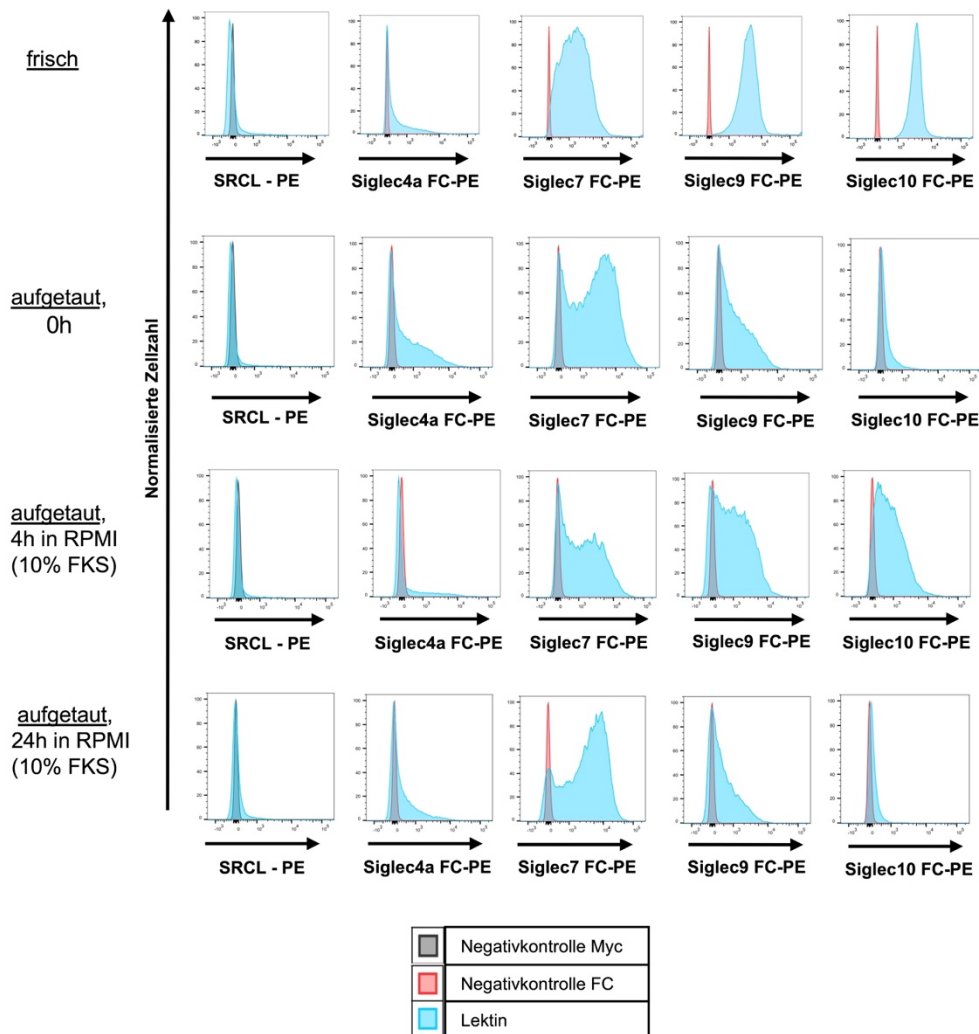


Abbildung 12 Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf einer pädiatrischen cALL, frisch und aufgetaut nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen. Die Leukämieprobe wurde im frischen Zustand durchflusszytometrisch untersucht. Ein Teil der Probe wurde mit 10% DMSO in FKS eingefroren und wieder aufgetaut, anschließend direkt oder nach vier bzw. 24 Stunden Kultivierung in RPMI (mit 10% FKS) durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt ist die Bindung der unterschiedlichen rekombinanten humanen Lektine an spezifische Glykanstrukturen auf der Oberfläche der Leukämieblasten. Dargestellt sind Histogramme von einer primären Leukämieprobe von insgesamt zwei unabhängigen Probenanalysen.

3.1.3 Frische pädiatrische und adulte primäre Leukämieproben

In dieser Arbeit wurden sowohl primäre ALL- als auch AML-Proben untersucht, da sich die leukämischen Blasten der einzelnen Unterformen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression

von Tumor-assoziierten Markern deutlich unterscheiden können. Aufgrund der Tatsache, dass sich das Glykosylierungsmuster durch den Einfrierprozess nicht vorhersagbar ändert und damit keine zuverlässigen Aussagen zu treffen sind, wurden im Folgenden nur noch frische Proben zur Analyse der Oberflächenglykosylierung herangezogen. Da die Fallzahlen für Neuerkrankungen von pädiatrischen AMLs im Gegensatz zu adulten AMLs deutlich geringer sind, wurden in dieser Doktorarbeit auch frische adulte AML-Proben (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler und PD Dr. Wellbrock, Hamburg) verwendet. Abbildung 13 zeigt ein Beispiel der Auswertung von primären Leukämieproben anhand einer pädiatrischen T-ALL.

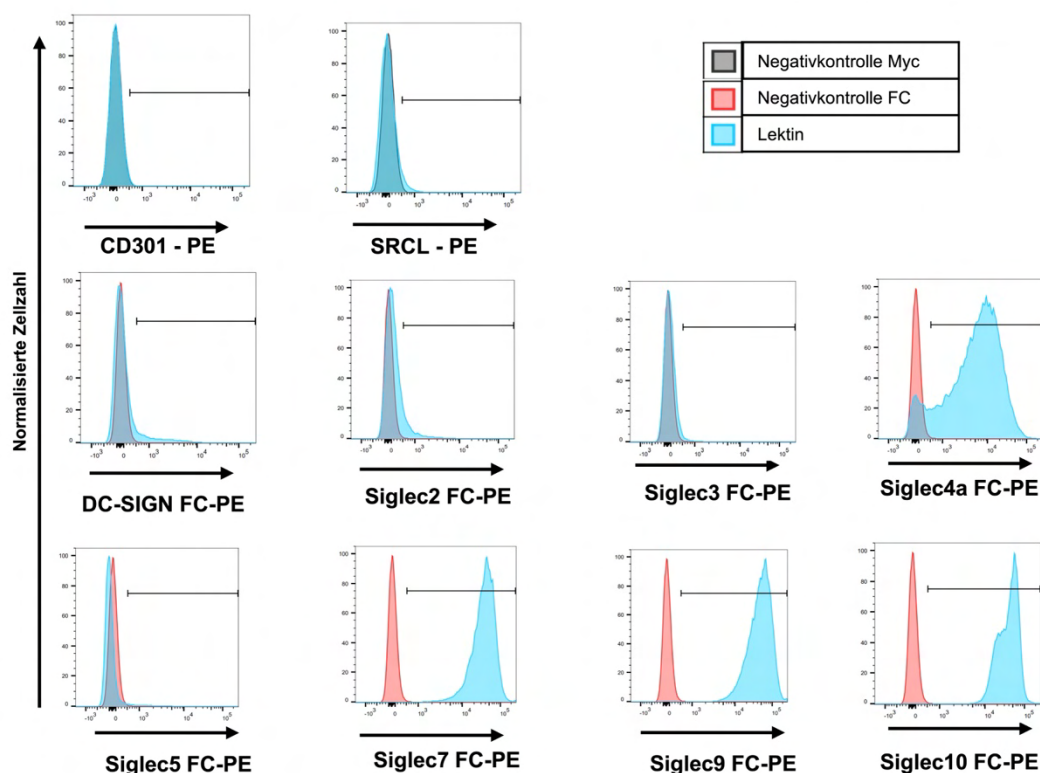


Abbildung 13 Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf einer pädiatrischen T-ALL. Die frische Leukämieprobe wurde durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenglykosylierung hin untersucht. Gezeigt ist die Bindung der unterschiedlichen Fluorophor-markierten humanen Lektine an die Zelloberfläche der Leukämieblasten. Dargestellt sind Histogramme von einer primären Leukämieprobe von insgesamt neun unabhängigen Probenanalysen.

Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Lektinbindung aller frischen pädiatrischen und adulten Leukämieproben zusammen. CD301 zeigte keinerlei Bindung an die primären Proben. SRCL zeigte eine präferenzielle Bindung an die adulten AML-Proben mit einem Maximum von 58,9% bei Probe 8. DC-SIGN hat schwach an die adulten AML-Proben 5 und 7 gebunden. Alle Proben waren negativ für die Liganden von Siglec2, Siglec3 und Siglec5. Mit Ausnahme von Probe 9, konnten in den getesteten Leukämien 51,8% bis 95,6% Siglec4a-positive Zellen detektiert werden. Die stärkste Bindung zeigten Siglec7 und

Siglec9, mit jeweils sechs Proben (sowohl pädiatrisch in einer cALL, T-ALL und AML als auch in adulten AMLs) über 90% Bindung. Siglec10 konnte ebenfalls stark (über 90%) an eine pädiatrische cALL und T-ALL, aber nicht an die pädiatrische AML binden. An adulte AMLs zeigte Siglec10 bei drei Proben eine starke Bindung.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Lektinbindung an spezifische Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche von verschiedenen frischen primären pädiatrischen und adulten Leukämieproben. Durchflusszytometrische Bestimmung der Lektinbindung, angegeben in Prozentwerten abzüglich der Negativkontrolle. cALL = common ALL, T-ALL = T-Zellbasierte ALL

Proben-nummer	Leukämie-typ	pädiatrisch/adult	Lektinbindung %									
			CD301	SRCL	DC-SIGN	Siglec2	Siglec3	Siglec4a	Siglec5	Siglec7	Siglec9	Siglec10
1	cALL	pädiatrisch	-1,1	10,3	4,9	13,6	4,7	51,8	3,1	96,5	98,6	98,7
2	cALL	pädiatrisch	0,1	3,5	2,4	2,3	0,1	52,6	1,4	42,7	22,4	2,3
3	T-ALL	pädiatrisch	0,2	4,3	10,2	10,6	1,9	88,5	3,9	98,4	98,7	98,6
4	AML	pädiatrisch	1,2	0,5	9,4	3,5	4,6	21,4	5,9	97,8	90,2	1,0
5	AML	adult	0,8	19,0	29,6	-0,7	8,1	89,1	2,2	96,8	97,4	96,0
6	AML	adult	1,3	10,9	3,0	0,8	0,6	56,2	-0,2	96,8	98,0	98,2
7	AML	adult	2,5	44,3	32,4	1,8	3,0	95,6	3,8	97,1	97,1	96,4
8	AML	adult	2,1	58,9	-3,7	-6,0	-7,3	7,7	-9,3	11,9	62,1	13,7
9	AML	adult	-0,5	6,9	12,6	0,8	0,9	72,7	2,5	66,6	87,2	9,4

	> 90%
	> 70%
	> 50%
	> 30%
	>10%
	< 10%

3.1.4 Periphere Blutzellen und hämatopoetische Stammzellen gesunder Spender

Zum Vergleich der spezifischen Glykosylierungsmuster wurden analog zu den Leukämiezellen im Folgenden gesunde Zellen des hämatopoetischen Systems mit rekombinanten Lektinen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden zunächst Zellen aus dem peripheren Blut analysiert.

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel der Auswertung von gesunden peripheren Blutzellen, aufgeteilt in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, anhand eines Spenders.

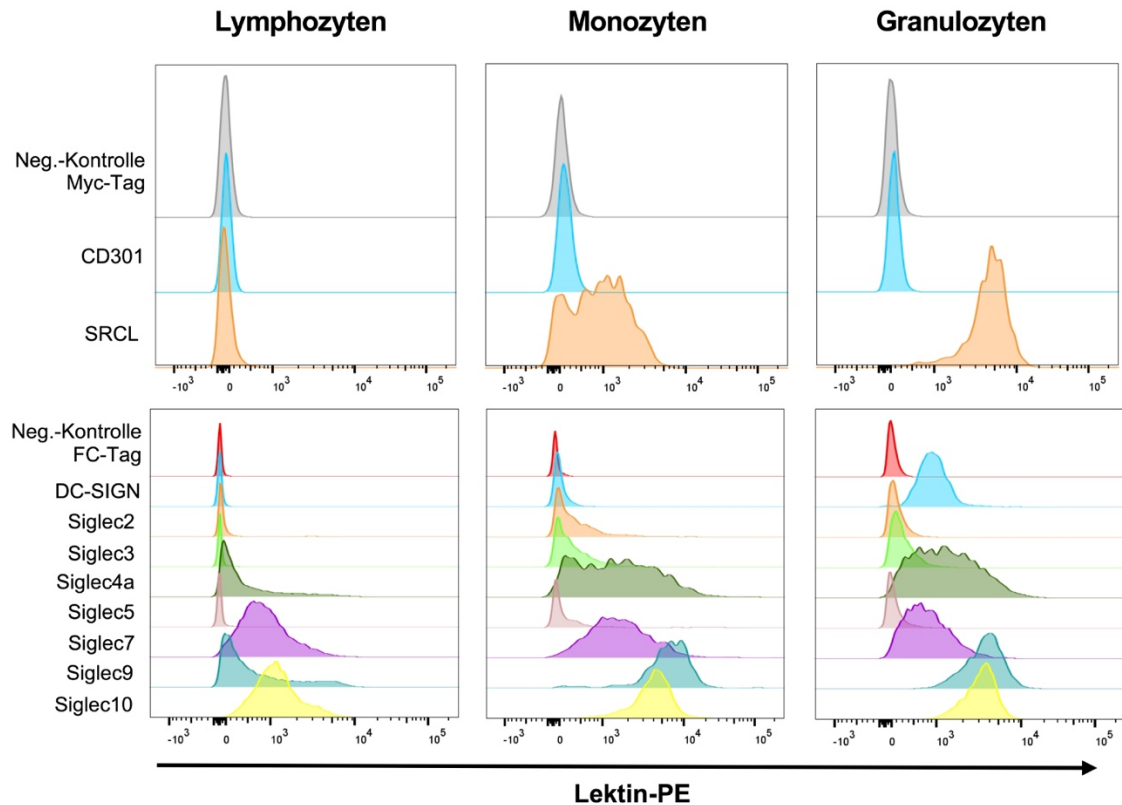


Abbildung 14 Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders. Die gesunde Blutprobe wurde durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenglykosylierung hin untersucht. Gezeigt ist die Bindung der unterschiedlichen Fluorophor-markierten humanen Lektine an spezifische Glykanstrukturen auf der Oberfläche der verschiedenen Blutzellpopulationen. Dargestellt sind Histogramme von einem Spender (Blutspender 2) von insgesamt sieben Spendern. Teile dieser Daten wurden publiziert in Prasse et al., 2024.

Tabelle 22 fasst die Ergebnisse der Lektinbindung an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus dem peripheren Blut aller gesunder Spender ($n = 7$) zusammen. CD301 zeigte keine Bindung an jegliche Blutzellpopulationen (Prasse et al. 2024). SRCL zeigte eine schwache Bindung an Lymphozyten (bis max. 14,9%), eine variable Bindung an Monozyten (zwischen 9,7% und 65%) und eine starke Bindung an die Granulozyten aller Spender (70%-97,5%). DC-SIGN konnte nicht an Lymphozyten, nur schwach an Monozyten, aber bis auf Spender 3 (18%) und 6 (63,4%) stark an Granulozyten binden (86,3%-95,4%). Siglec2 und Siglec5 zeigte keine relevante Bindung und Siglec3 zeigte eine zum Teil schwach bis mäßige Bindung an Monozyten und Granulozyten. Bei Siglec4a ergab sich ein heterogenes Muster zwischen den Blutspendern: Die Lymphozyten zeigte eine Bindung zwischen 7,5% bis 57,9%, die Monozyten rangierten zwischen 19,9% und 90,9% und die Granulozyten zwischen 16,2% bis 95,7%. Das Bindeverhalten von Siglec7 zeigte ebenfalls ein variables Muster unter den Blutspendern, mit jeweils geringem (<10%) bis großem Anteil positiver Zellpopulationen (>90%). Siglec9 zeigte eine Bindung von 0,7% bis 69,8 % an Lymphozyten und eine vornehmlich starke Bindung an Monozyten und

Granulozyten. Die Lymphozyten wiesen eine geringe bis mäßige Positivität (8,4%-29,8%) mit Siglec10 auf. Ausnahme war hier nur Spender 2 mit 98,3%. Der Anteil der Monozyten, die mit Siglec10 angefärbt werden konnten, variierte zwischen 24% und 98,6%. Auch hier war Spender 2 mit 98,6% auffällig. Die Granulozyten von drei Spendern (2, 4 und 5) zeigten eine starke Bindung (>90%) von Siglec10, während nur auf 18,9% bis 48,3% der Granulozyten der übrigen Spender Siglec10-Liganden nachweisbar waren. Bezogen auf die Blutzellpopulationen ergaben sich im Bindeverhalten nur bei einigen Lektinen konsistente Muster zwischen den verschiedenen Blutspendern. Die drei Blutzellpopulationen waren negativ für die Liganden von CD301 (Prasse et al. 2024). Lymphozyten zeigten keine Bindung von SRCL, DC-SIGN, Siglec2, Siglec3 und Siglec5. SRCL konnte stark (>70%) an die Granulozyten aller Spender binden. Insgesamt ist in dieser Stichprobe das Glykosylierungsprofil auf den peripheren Blutzellen vorherrschend interindividuell und heterogen.

Tabelle 22 Zusammenfassung der Lektinbindung an spezifische Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus peripherem Blut verschiedener gesunder Spender. Durchflusszytometrische Bestimmung der Lektinbindung, angegeben in Prozentwerten abzüglich der Negativkontrolle. Teile dieser Daten wurden publiziert in Prasse et al., 2024.

Population	Spender	Lektinbindung %										
		CD301	SRCL	DC-SIGN	Siglec2	Siglec3	Siglec4a	Siglec5	Siglec7	Siglec9	Siglec10	
Lymphozyten	1	1,0	10,5	0,6	2,9	3,9	29,4	5,6	18,4	29,4	9,8	
Lymphozyten	2	-0,4	1,5	-0,1	10,7	5,2	57,9	6,1	93,8	69,8	98,3	
Lymphozyten	3	0,0	9,7	-1,7	5,6	3,6	24,3	3,5	6,3	27,9	11,5	
Lymphozyten	4	-0,1	9,0	-1,1	8,2	5,2	8,6	2,9	52,2	6,4	27,7	
Lymphozyten	5	9,0	6,1	-2,5	11,2	4,0	7,5	3,2	38,4	0,7	29,8	
Lymphozyten	6	1,4	14,9	0,8	5,5	3,8	41,5	4,2	38,7	48,1	11,9	
Lymphozyten	7	0,1	12,4	-0,7	4,7	3,6	27,9	5,7	26,4	21,4	8,4	
Monozyten	1	1,3	37,0	24,8	17,5	47,0	72,3	22,9	29,3	80,7	60,5	
Monozyten	2	0,2	65,0	5,2	37,1	35,1	80,9	23,1	93,1	97,0	98,6	
Monozyten	3	0,9	20,5	18,0	0,9	12,9	48,8	8,1	18,8	75,0	24,0	
Monozyten	4	-0,1	12,8	6,9	16,1	16,1	22,7	10,6	0,8	14,9	44,7	
Monozyten	5	0,9	32,1	5,0	7,5	30,2	19,9	7,7	54,1	40,8	56,8	
Monozyten	6	-0,3	9,7	5,4	11,7	23,2	49,4	27,6	39,2	58,0	35,3	
Monozyten	7	2,0	42,2	28,4	11,1	24,5	56,8	16,0	37,9	80,9	50,5	
Granulozyten	1	1,1	89,7	87,2	1,8	7,7	54,4	3,6	6,3	76,2	19,7	
Granulozyten	2	0,6	97,5	95,4	10,2	66,4	95,7	33,4	93,5	98,3	98,4	
Granulozyten	3	0,4	86,4	18,0	0,9	12,9	48,8	8,1	18,8	75,0	24,0	
Granulozyten	4	0,2	85,0	86,3	8,0	52,3	28,0	16,5	83,2	47,3	93,4	
Granulozyten	5	2,7	79,4	88,9	2,3	19,5	16,2	6,7	52,5	13,4	93,9	
Granulozyten	6	1,4	70,0	63,4	2,1	12,4	65,8	5,6	28,8	83,8	48,3	
Granulozyten	7	-0,2	91,2	91,2	3,9	7,6	40,8	6,2	8,5	70,1	18,9	

> 90%

> 70%

> 50%

> 30%

>10%

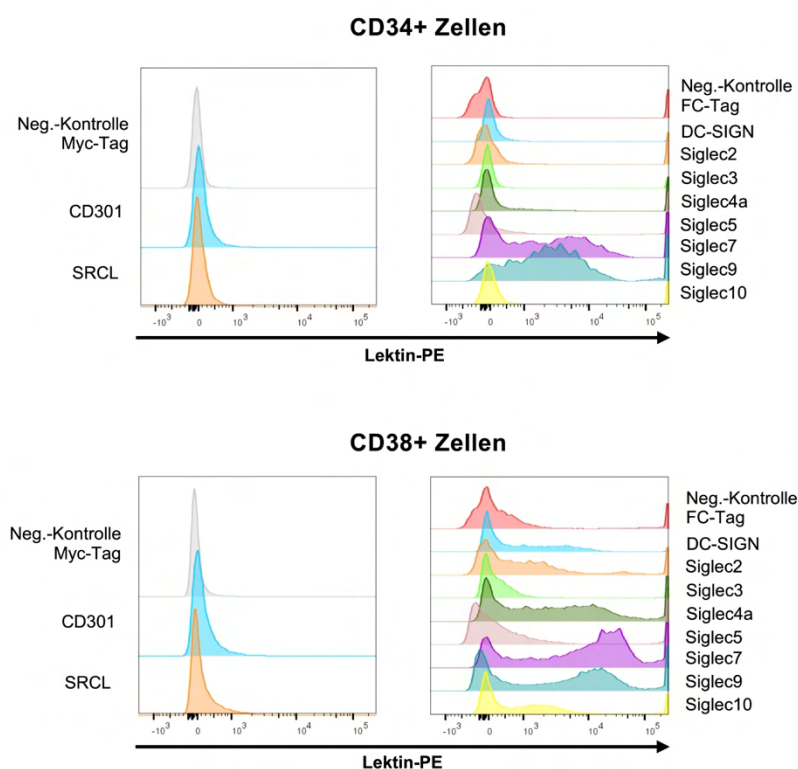
< 10%

Falls periphere Blutzellen durch überlappende Antigenexpression durch eine CAR-T-Zelltherapie geschädigt oder sogar eliminiert werden würden, wäre dies potentiell und bis zu einem gewissen Maß tolerabel, da diese aus den hämatopoetischen Stammzellen nachgebildet werden könnten, solange diese von der Toxizität nicht betroffen sind. Daher

wurde im letzten Schritt das spezifische Glykosylierungsprofil von CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark gesunder Spender untersucht, indem wie zuvor die Zellen mit rekombinanten Lektinen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Abbildung 15A zeigt ein Beispiel der Auswertung der Lektinbindung an CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen anhand eines gesunden Spenders (nach Markierung der Stammzellen mittels Anti-CD34 und Anti-CD38 Antikörper). In Abbildung 15B ist die Δ MFI (MFI der Lektine abzüglich des Isotyps) der Lektinbindung an die jeweils CD34⁺ und CD38⁺ Zellen aller drei gesunder Spender im Vergleich gezeigt. CD301 zeigte, passend zu den Ergebnissen der Bindung an die peripheren Blutzellen, auch keine Bindung an die Stammzellen (Prasse et al. 2024). Eine Bindung an die CD34⁺ Stammzellen in hohem Maße zeigten nur die Lektine Siglec7 und Siglec9 bei allen drei Proben. Im direkten Vergleich zeigte sich die höchsten Bindung bei Spender 3, bei der die Δ MFI um bis zu zehnmal höher ist als bei Spender 1 und 2. Bezüglich der CD38⁺ Stammzellen konnten fast alle Lektine binden, wenn auch in sehr unterschiedlichem Maße. Besonders hoch fällt die Δ MFI erneut bei Siglec7 und Siglec9 auf, ebenfalls mit einem Maximum von Siglec9 bei Spender 3. Auch Siglec4a und Siglec10 zeigten bei unterschiedlichen Spendern eine erhöhte Δ MFI.

Das spezifische Glykosylierungsprofil in dieser kleinen Stichprobe von drei Spendern zeigt, dass besonders die Liganden von Siglec7 und Siglec9 auf der Zelloberfläche von CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen vorhanden sind, die Δ MFI dabei allerdings interindividuell zum Teil erheblich verschieden ist.

A



B

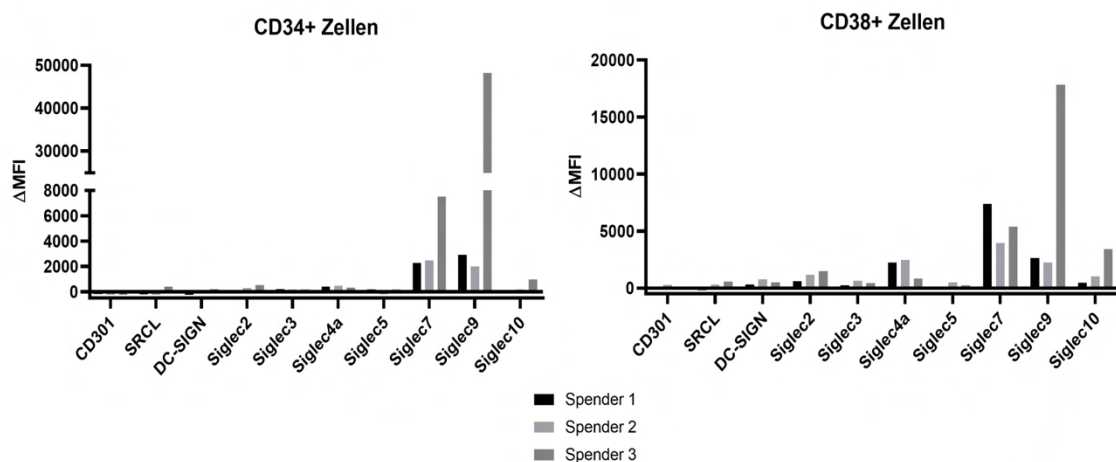


Abbildung 15 Färbung spezifischer Glykanstrukturen auf der Oberfläche von CD34⁺ und CD38⁺ hämatopoetischen Stammzellen. (A) Gezeigt ist die Bindung der unterschiedlichen rekombinanten humanen Lektine an spezifische Glykanstrukturen auf der Oberfläche von CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen aus gesundem Knochenmark. Dargestellt sind Histogramme von einem Spender (Spender 1) von insgesamt drei unabhängigen Spenderanalysen. (B) Darstellung des Deltas (Δ) der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Bindung der zehn verschiedenen Lektine an jeweils CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark von drei gesunden Spendern. Die Berechnung der Δ MFI ergibt sich aus der MFI des jeweiligen Lektins abzüglich der MFI des Isotyps. Teile dieser Daten wurden publiziert in Prasse et al., 2024.

3.2 Klonierung der LEC-CARs

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse bezüglich der Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen und gesunden Zellen des hämatopoetischen Systems wurden die beiden Lektindomänen von SRCL und Siglec7 zur Generierung von Fusions-LEC-CARs ausgewählt. Die CRD der beiden Lektine wurden jeweils über eine Fusions-PCR in den beiden möglichen Reihenfolgen (terminal SRCL oder Siglec7) miteinander kombiniert und anschließend über Restriktion (mit den Enzymen BamHI und NruI) und Ligation in den pBullet Vektor eingebracht (siehe (s.) beispielhaft Abbildung 4, die restlichen Vektorkarten befinden sich im Anhang 1 bis Anhang 11). Über eine IRES ist das CAR-Konstrukt mit GFP verknüpft, welches als Expressionsreporter dient. Zusätzlich wurden zu jedem Fusionskonstrukt jeweils einzelne LEC-CARs mit SRCL und Siglec7 als Kontrollen angefertigt.

Alle LEC-CARs sind CARs der 2. Generation und enthalten ein humanes IgG1-Fragment, die CD28-Transmembrandomäne sowie CD28 als costimulatorische Domäne und CD3 ζ als intrazelluläre Signaldomäne. Insgesamt wurden zwölf LEC-CARs in je drei verschiedenen Versionen aller Fusions- und Einzel-LEC-CARs kloniert (Abbildung 16). In der ersten Version der LEC-CARs ist die CRD direkt an die IgG1-Domäne gebunden und im Fusions-LEC-CAR trennt ein dreifacher Glycin-Serin-Linker ((GGSG)₃ mit 36 Basenpaaren) die beiden Lektindomänen voneinander (Abbildung 16: A links, B oben). In der zweiten Version der LEC-CARs mit Linker wurde ein anderer Glycin-Serin-Linker verwendet ((G4S)₃ mit 45 Basenpaaren). Dieser wurde in allen LEC-CARs mit Linker zwischen der CRD und der IgG1-Domäne für einen größeren Abstand zwischen CRD und Plasmamembran und für eine erhöhte Flexibilität der Domänen und damit der Bindungsfähigkeit eingesetzt. Zusätzlich diente dieser Linker auch als Abstandshalter zwischen den Lektindomänen in den Fusions-CARs mit Linker (Abbildung 16: A Mitte, B Mitte). Die letzte Version der LEC-CAR mit Linker Myc entspricht vom Aufbau den LEC-CARs mit Linker, enthält aber zusätzlich noch einen terminalen Myc-Tag für eine bessere Nachweismöglichkeit der LEC-CARs an der Zelloberfläche der NK92-Zellen (Abbildung 16: A rechts, B unten).

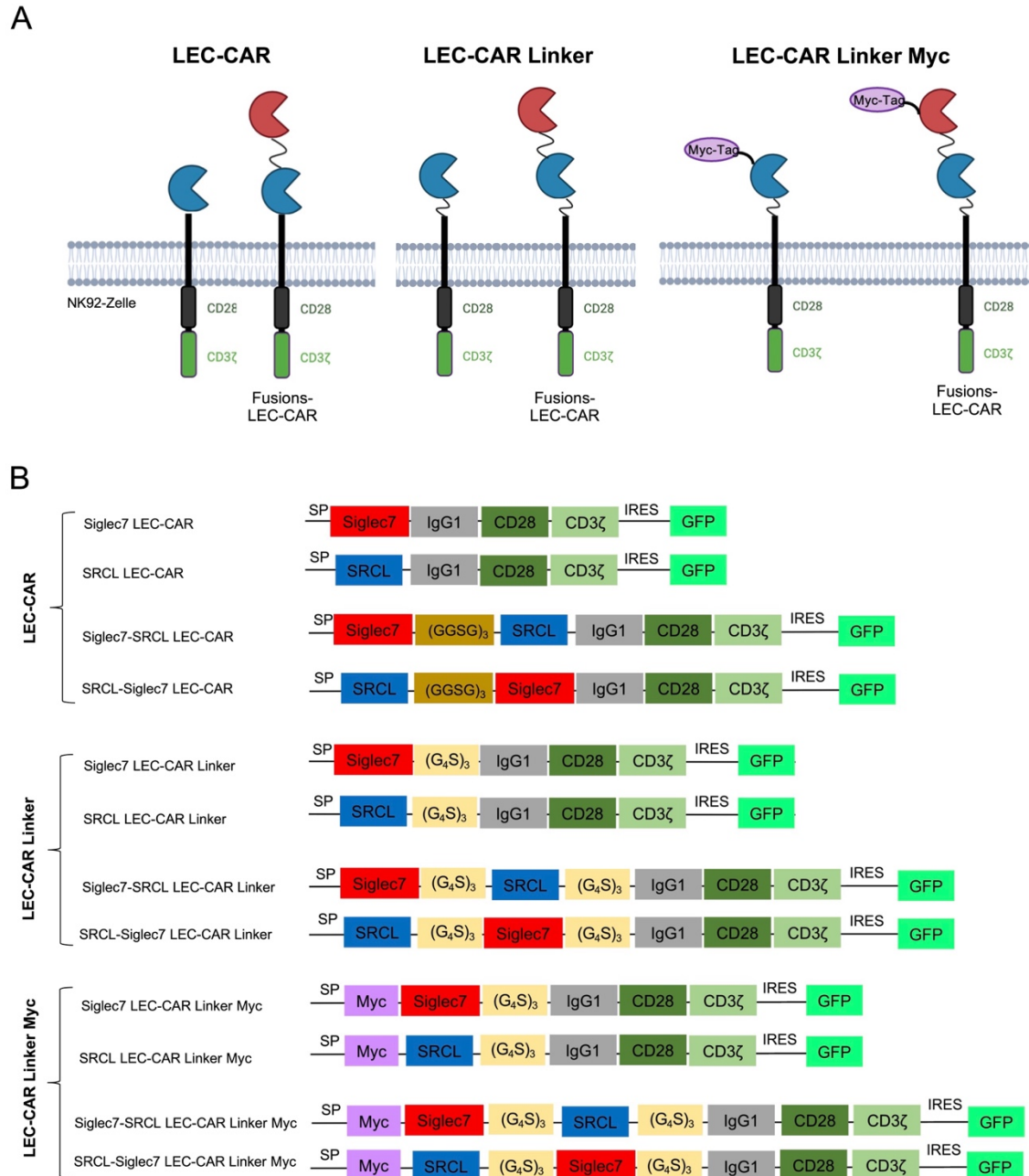


Abbildung 16 Schematischer Aufbau der (Fusions-)LEC-CARs. (A) Vergleich der LEC-CARs ohne Linker, LEC-CARs mit Linker und LEC-CARs mit Linker und terminalen Myc-Tag jeweils als einzelner LEC-CAR oder Fusions-LEC-CAR aus zwei kombinierten Lektindomänen. Die Abbildung wurde mit *BioRender.com* erstellt. (B) Reihenfolge der einzelnen Domänen in den LEC-CARs: alle sind CARs der 2. Generation und enthalten humanes IgG1, die Transmembrandomäne und die costimulatorische Domäne von CD28 sowie CD3ζ als intrazelluläre Signaldomäne. In den Fusions-LEC-CARs sind die beiden Lektindomänen entweder durch einen (GGSG)₃- oder durch einen (G₄S)₃-Linker voneinander getrennt. Die LEC-CAR Linker Myc enthalten zusätzlich einen terminalen Myc-Tag zum Oberflächennachweis. SP = Signalpeptid, IgG1 = Immunglobulin G1, IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle, GFP = grün fluoreszierendes Protein

Anschließend wurden NK92-Zellen mit den CAR-Konstrukten transduziert. Die Transduktionsrate, gemessen an der Expression des GFP, lag zwischen 4,7% und 30,8%. Nach Abschluss der durchflusszytometrischen Zellsortierung lag der Anteil der GFP-positiven Zellen bei mindestens 76,2% (Abbildung 17).

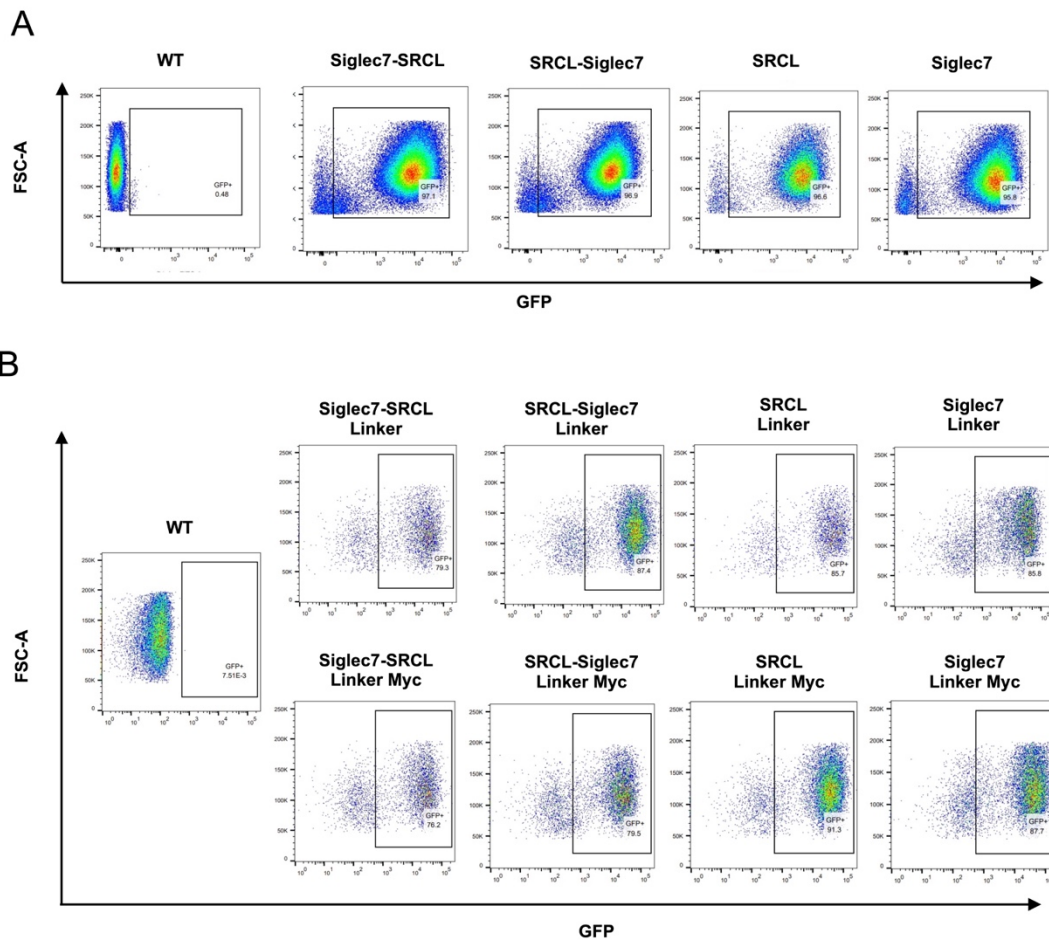


Abbildung 17 Bestimmung der GFP-Expression nach Transduktion und Sortierung der verschiedenen LEC-CAR tragenden NK92-Zellen. (A) Die LEC-CARs ohne Linker wurden nach Transduktion und Sortierung durchflusszytometrisch auf die Expression des Reportergens GFP hin untersucht. Wildtyp NK92 dienten als Negativ-Kontrolle. (B) Die LEC-CARs mit Linker sowie LEC-CARS mit Linker und Myc-Tag wurden nach Transduktion und Sortierung durchflusszytometrisch auf die Expression des Reportergens GFP hin untersucht. Wildtyp NK92 dienten als Negativ-Kontrolle.

3.3 Oberflächenlokalisierung und Bindungseigenschaften der LEC-CARs

3.3.1 Oberflächennachweis mit den Antikörpern Anti-Myc und Anti-Siglec7

Bei allen mit den LEC-CARs transduzierten NK92 konnte GFP durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, die eingebrachte DNA der LEC-CARs wurde also erfolgreich in die Effektorzellen integriert. Das erlaubt allerdings noch keine Aussage darüber, ob der LEC-CAR auch an die Zelloberfläche der NK92-Zellen transportiert wird. Dafür wurde im Folgenden versucht, die LEC-CARs mit zwei verschiedenen Antikörpern auf der Zelloberfläche nachzuweisen.

Dafür wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt. Mit einem Anti-Myc Antikörper sollten alle LEC-CARs mit terminalem Myc-Tag nachweisbar sein (Abbildung 18A). Tatsächlich konnte der Anti-Myc Antikörper nur an den Siglec7-SRCL LEC-CAR mit Linker

Myc sowie an den Siglec7-LEC-CAR mit Linker Myc binden. Bei den beiden LEC-CARs mit terminaler SRCL-Domäne (SRCL-Siglec7 LEC-CAR mit Linker Myc und SRCL LEC-CAR mit Linker Myc) konnte der Myc-Tag nicht detektiert werden (Abbildung 18B). Der Anti-Myc-Antikörper zeigte keinerlei Bindung an alle LEC-CAR Linker ohne Myc-Tag und an den Wildtyp (WT), die als Kontrollen verwendet wurden.

Als zweite Nachweismethode wurde ein Anti-Siglec7 Antikörper eingesetzt, der theoretisch die Siglec7-Domäne in allen Fusions-LEC-CARs und im einzelnen Siglec7-LEC-CAR mit und ohne Linker erkennen kann (Abbildung 18A). Die stärkste Bindung zeigte sich an den SRCL-Siglec7 LEC-CAR, gleich stark in der Version mit und ohne Linker. In geringerer Intensität konnte der Anti-Siglec7 Antikörper auch an den einzelnen Siglec7 LEC-CAR und den Siglec7-SRCL LEC-CAR binden. Auch hier wurde die Bindung durch den Linker nicht beeinträchtigt. Die Negativkontrollen SRCL LEC-CAR und Wildtyp wurden durch den Anti-Siglec7 Antikörper nicht angefärbt (Abbildung 18C).

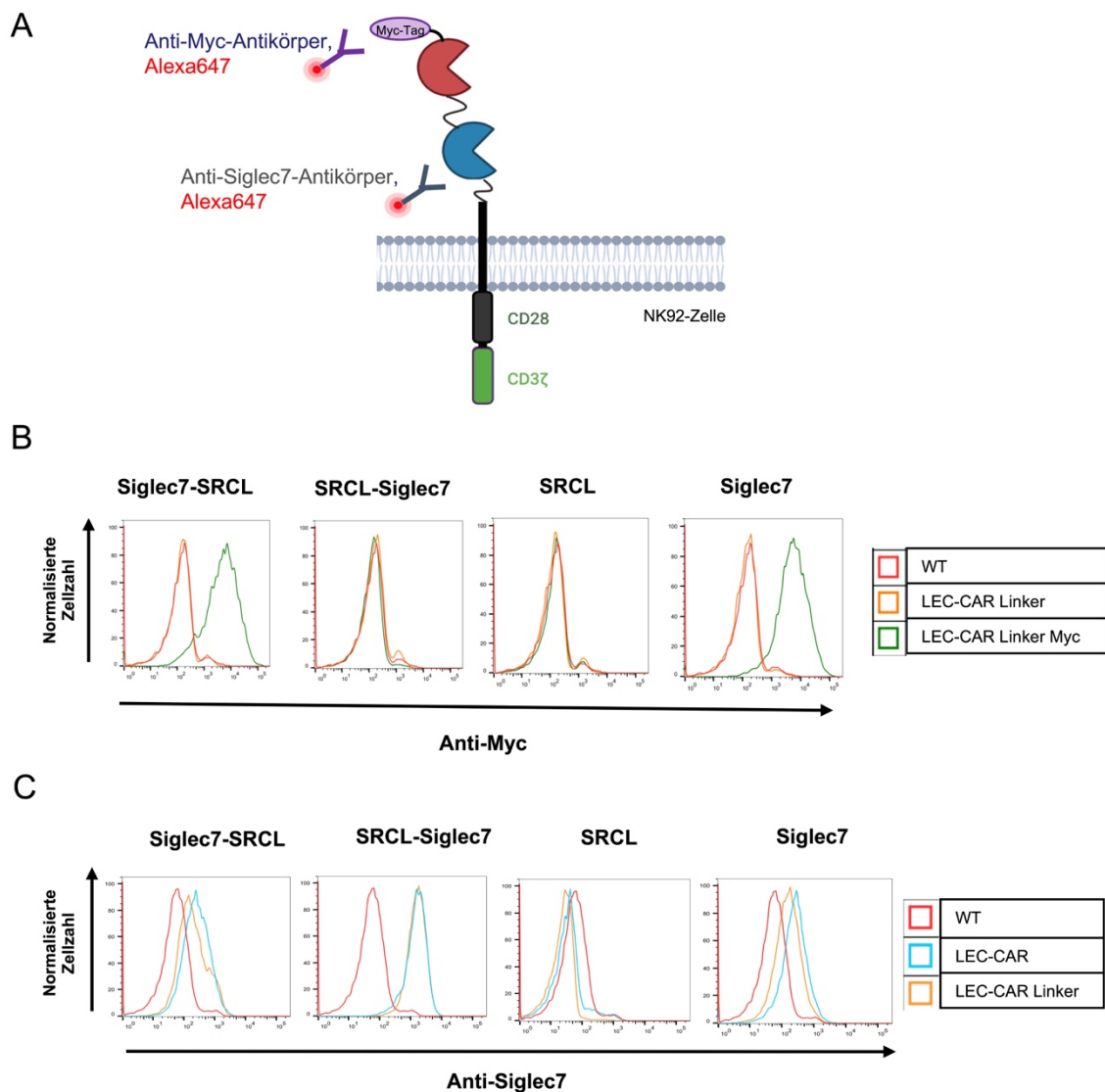


Abbildung 18 Oberflächennachweis der LEC-CARs mit den Antikörpern Anti-Myc und Anti-Siglec7. (A) LEC-CARs mit Myc-Tag wurden mit einem Anti-Myc-Antikörper und alle LEC-CARs mit der Siglec7-Domäne mit einem Anti-Siglec7-Antikörper analysiert. Die Abbildung wurde mit *BioRender.com* erstellt. (B) Ergebnisse der Bindung des Anti-Myc-Antikörper an die NK92 mit Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR Linker mit (grün) und ohne (orange) Myc-Tag. Wildtyp NK92 (rot) dienten als Kontrollen. (C) Ergebnisse der Bindung des Anti-Siglec7-Antikörper an die NK92 mit Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR mit (orange) und ohne Linker (blau). Wildtyp NK92 (rot) dienten als Kontrolle.

3.3.2 Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre Glykoliganden

In der Annahme, dass die LEC-CARs mit Linker ohne Myc-Tag bei Nachweis des terminalen Myc-Tags des sonst sequenzgleichen LEC-CARs mit Linker und Myc-Tag ebenfalls auf der Oberfläche der NK92-Zellen exprimiert werden, konnten alle LEC-CARs mit Ausnahme des SRCL-LEC-CAR in allen drei Versionen auf der Oberfläche mit mindestens einer Methode nachgewiesen werden. Um die Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre jeweiligen Glykanliganden zu untersuchen, wurden synthetische Glykankonjugate verwendet, die an ein mit Biotin markierten Polyacrylamid-Rückgrat (PAA) gebunden sind. Diese wurden mit fluoreszierenden Streptavidin inkubiert und anschließend auf die LEC-CAR tragenden NK92-Zellen gegeben (Abbildung 19A).

Die Bindungsfähigkeit der SRCL-Domäne kann mit dem Trisaccharid Lewis X untersucht werden, das von SRCL spezifisch gebunden wird. Lewis X zeigte eine Bindung an den einzelnen SRCL LEC-CAR und zwar geringfügig besser in der Linker-Version (Abbildung 19B). Die Bindung von Lewis X an SRCL scheint spezifisch zu sein, da keinerlei Bindung an den einzelnen Siglec7 LEC-CAR und die Wildtyp-Zellen festgestellt wurde. In den Fusions-LEC-CARs war die SRCL-Domäne nur in einer Reihenfolge bindungsfähig und zwar im SRCL-Siglec7 LEC-CAR, auch hier wieder geringfügig besser in der Version mit Linker (Abbildung 19B). Dieser Fusions-LEC-CAR mit terminaler SRCL-Domäne konnte, trotz seiner hier nachgewiesenen Bindungsfähigkeit, in der Version mit Myc-Tag im vorherigen Experiment nicht durch den Anti-Myc-Antikörper an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 18B). Im Gegensatz dazu zeigte die näher an der Plasmamembran gelegene SRCL-Domäne im Siglec7-SRCL LEC-CAR keinerlei Bindung an seinen Liganden, obwohl dieser CAR mit dem Anti-Myc Antikörper und Anti-Siglec7 Antikörper sicher an der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Die Bindung von Lewis X wurde nicht unspezifisch durch das Polyacrylamid-Rückgrat beeinflusst, da das alleinige Verwenden von PAA zu keinerlei Bindung führte (Abbildung 19B).

Die Kohlenhydratantigene (Sia)₃ und 6'SLN können durch ihre terminale Sialinsäure von Siglec7 gebunden werden. Hier zeigte sich allerdings in keiner Kombination der Fusions-LEC-CARs und auch nicht im einzelnen Siglec7 LEC-CAR eine Bindung (Abbildung 19B).

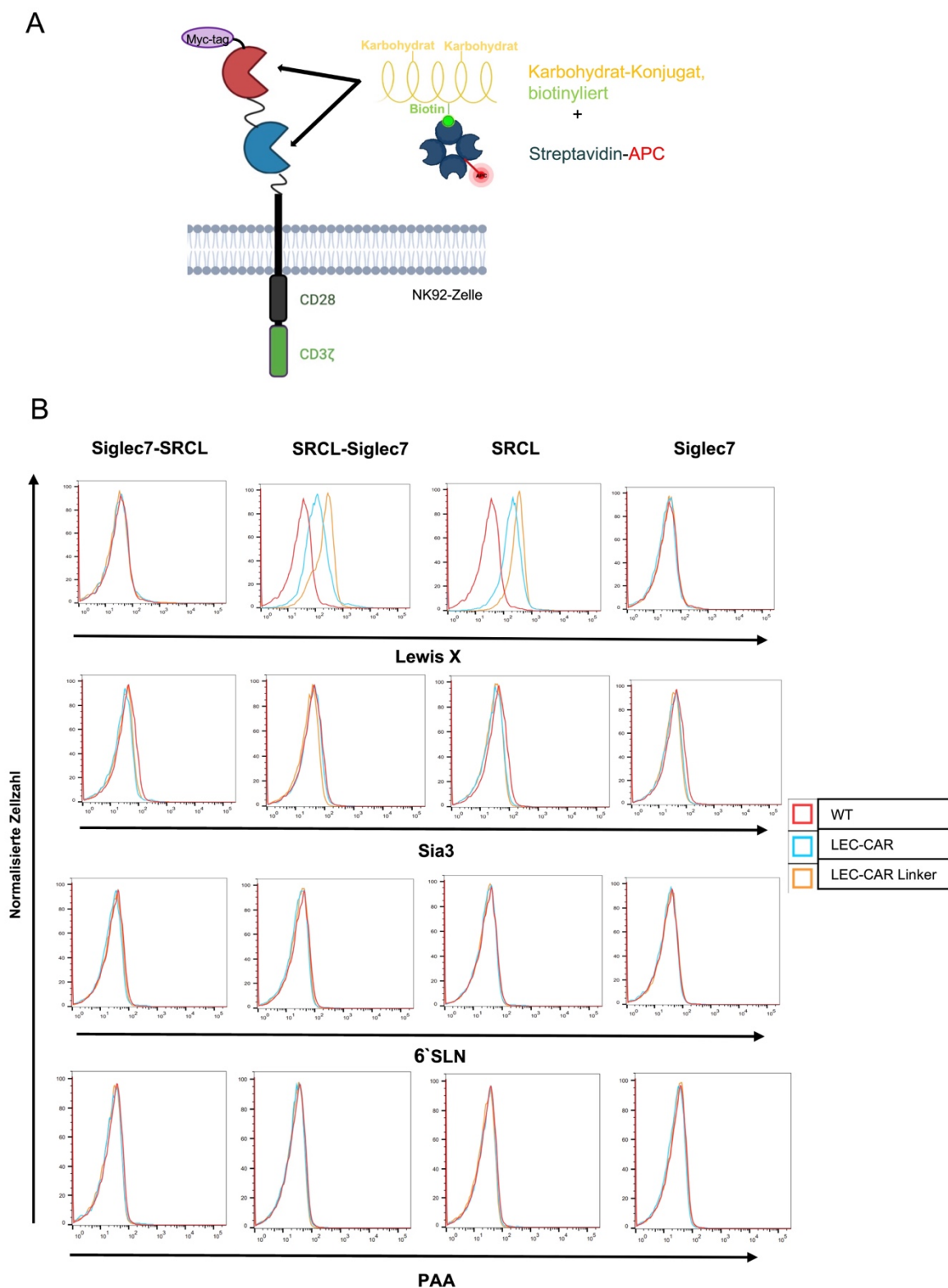


Abbildung 19 Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre Glykanliganden. (A) Synthetische Karbohydratantigene, die an ein mit Biotin markiertes Polyacrylamid-Rückgrat gebunden sind, wurden mit fluoreszierendem Streptavidin inkubiert und anschließend auf die LEC-CAR tragenden NK92-Zellen gegeben. Die Abbildung wurde mit *BioRender.com* erstellt. (B) Dargestellt ist die Bindung von Lewis X, Sia3, 6'SLN und Aminoglucitol (PAA, Negativkontrolle) an die NK92-Zellen mit Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR mit (orange) und ohne Linker (blau). Der Wildtyp (rot) diente als Negativkontrolle.

Sia3 = (Neu5Ac α)3-C3, 6'SLN = Neu5Ac α 2-6Galb1-4GlcNAcb-OCH₂CH₂CH₂NH₂, PAA = Aminoglucitol

3.4 Funktionelle Testung der LEC-CARs gegenüber Leukämiezellen

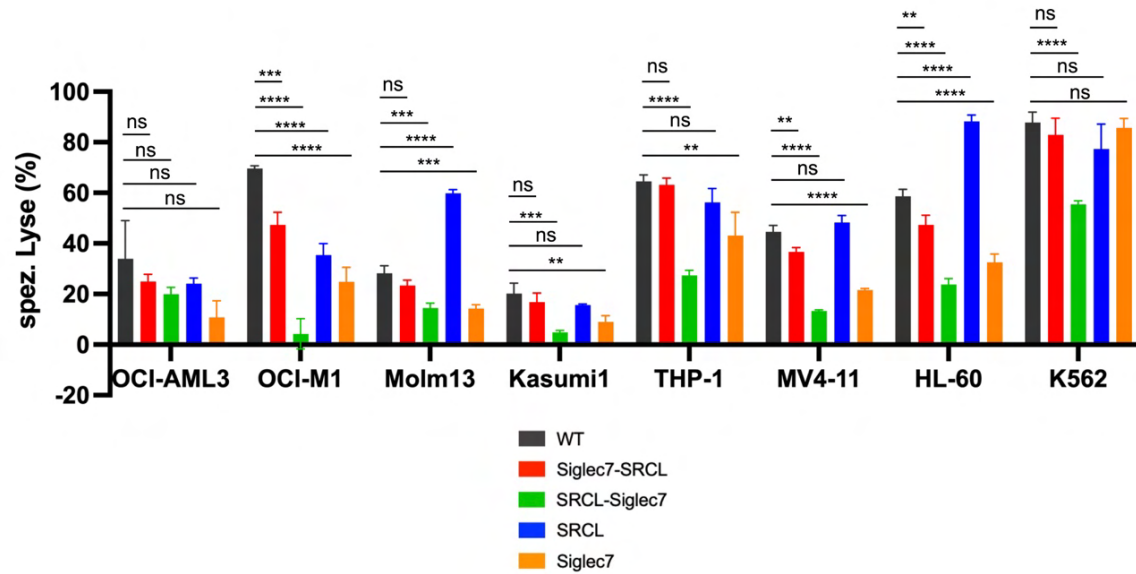
Nachdem die LEC-CARs entweder mit den spezifischen Antikörpern Anti-Myc und Anti-Siglec7 oder durch die Bindung ihres Liganden Lewis X auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob nach Bindung der Zuckerliganden auf den Leukämiezellen die Signaltransduktion in den NK92-Zellen mit LEC-CARs auch zur Auslösung von Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion (Interferon gamma) führt. Die LEC-CARs mit Linker und Myc-Tag wurden dafür nicht weiterverwendet, da der Myc-Tag primär für die Nachweisbarkeit an der Zelloberfläche verwendet wurde.

3.4.1 Zytotoxizität von LEC-CARs ohne Linker

Zunächst wurde die Zytotoxizität aller LEC-CARs und LEC-CARs Linker im Vergleich mit den Wildtyp NK92 gegenüber den Leukämiezelllinien OCI-AML3, OCI-M1, Molm13, Kasumi1, THP-1, MV4-11 und HL-60 untersucht, deren Oberflächenglykosylierung in Abbildung 11 gezeigt ist. Die HLA-negative Zelllinie K562 diente als CAR-unabhängige Positiv-Kontrolle für die natürliche Zytotoxizität der NK92-Zellen. Die Effektorzellen wurden 48 und 24 Stunden vorher mit humanen IL-2 stimuliert und anschließend in einem Verhältnis von 10:1 eingesetzt.

Die kombinierten Siglec7-SRCL und SRCL-Siglec7 LEC-CARs und der einzelne Siglec7 LEC-CAR zeigten keine spezifische Zytotoxizität gegenüber den Leukämiezelllinien. Der SRCL LEC-CAR hingegen zeigte eine spezifische und signifikant bessere Zytotoxizität um mindestens 30% im Vergleich mit dem Wildtyp NK92 gegenüber den Lewis X-positiven Zelllinien Molm13 und HL-60. Die schwach Lewis X-positiven Zelllinien Kasumi-1, MV4-11, THP-1 und die negative Zelllinie OCI-M1 wurden nicht getötet. Die Positivkontrolle mit den K562-Zellen zeigte im Vergleich ein ausreichend hohes Killing aller LEC-CARs auf einem Niveau mit dem Wildtyp. Eine Ausnahme bildete der SRCL-Siglec7 LEC-CAR, der sowohl gegenüber K562 als auch allen anderen Leukämiezelllinien eine geringere Zytotoxizität zeigte (Abbildung 20A). Zusätzlich wurde ein begleitender MTT-Versuch zur Einschätzung der metabolischen Aktivität und damit Vergleichbarkeit von Vitalität und der eingesetzten Anzahl an Effektorzellen durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine relevanten Unterschiede (Abbildung 20B). Dieser Versuch wurde ein zweites Mal unabhängig wiederholt und ist im Anhang 12 dargestellt.

A



B

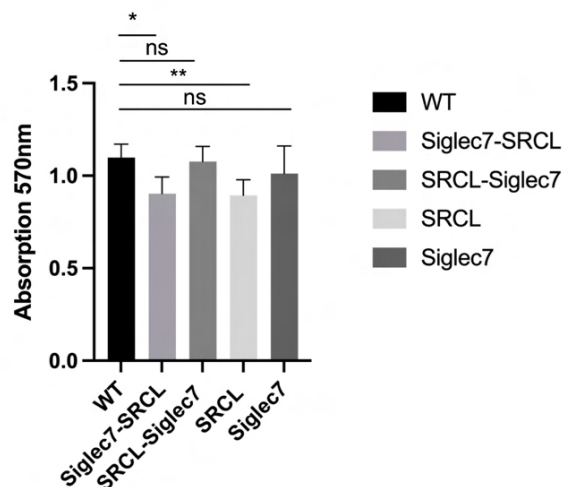


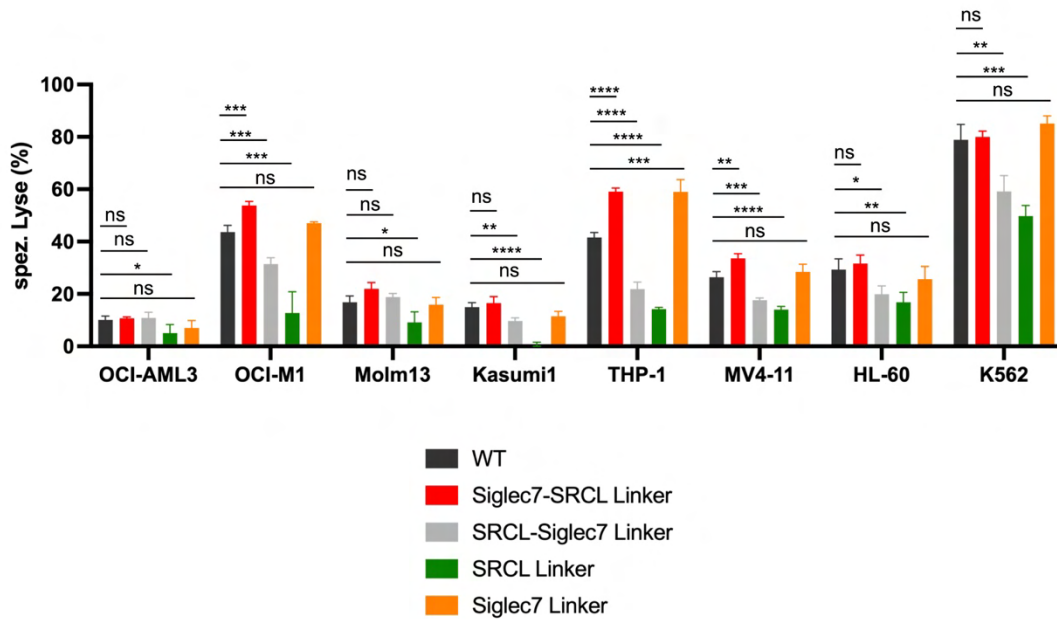
Abbildung 20 Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs ohne Linker. (A) Wildtyp und Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1 mit den angegebenen Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Balken stellen Mittelwerte von Quadruplikaten dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

3.4.2 Zytotoxizität von LEC-CARs mit Linker

Nach demselben Schema wurden auch die entsprechenden LEC-CARs mit Linker hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Es ergab sich insgesamt keine signifikant bessere Tötung im Vergleich mit den Wildtyp (einzelne abgebildete statistisch signifikante

Unterschiede konnten in weiteren unabhängigen Versuchen nicht wiederholt werden, s. Anhang 13 und Anhang 14). Es zeigte sich gegenüber K562 und anderen Zelllinien ein niedrigeres zytotoxisches Niveau vom SRCL-Siglec7 Linker und SRCL Linker (Abbildung 21A). Der begleitende MTT-Assay zeigte keine Unterschiede zwischen den Effektorzellen (Abbildung 21B).

A



B

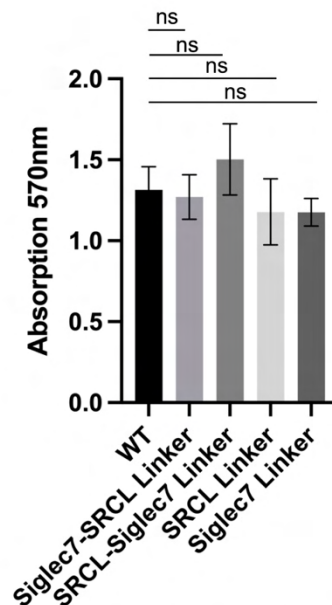
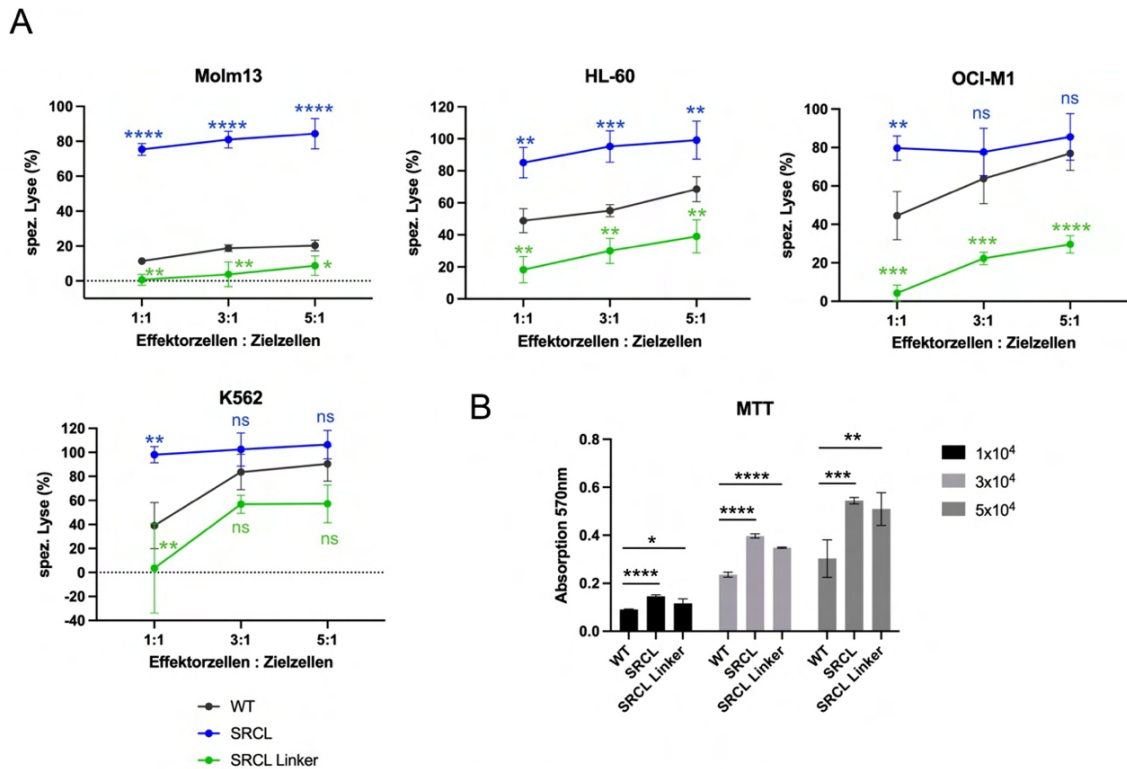


Abbildung 21 Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs mit Linker. (A) Wildtyp und Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1 mit den angegebenen Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Balken stellen

Mittelwerte von Quadruplikaten dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

3.4.3 Zytotoxizität des SRCL LEC-CARs mit und ohne Linker

Im Folgenden wurde der SRCL LEC-CAR hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber den Lewis X-positiven Zelllinien Molm13 und HL-60 sowie gegenüber der Lewis X-negativen Zelllinie OCI-M1 als Kontrolle näher untersucht. Um den Einfluss des Linkers auf die zytotoxische Kapazität zu untersuchen, wurde der SRCL LEC-CAR Linker direkt verglichen. Des Weiteren wurden verschiedene Effektor:Zielzell-Verhältnisse von 1:1, 3:1 und 5:1 eingesetzt, um die spezifische Aktivierung des LEC-CARs zu überprüfen. Schon bei der niedrigen Ratio von 1:1 zeigte der SRCL LEC-CAR ohne Linker eine hohe Zytotoxizität von 75% gegenüber Molm13 und 85% gegenüber HL-60 (der Wildtyp hingegen gegenüber Molm 13 nur 11% und gegenüber HL-60 nur 49%). Durch das Einsetzen höherer Ratios konnte die Zytotoxizität nicht mehr relevant gesteigert werden. Gegenüber den Lewis X-negativen OCI-M1 ergaben sich bis auf die Ratio 1:1 (SRCL LEC-CAR tötet um 35% mehr) keine Unterschiede zwischen SRCL LEC-CAR und dem Wildtyp. Der SRCL LEC-CAR mit Linker war gegenüber allen Zelllinien nur gering und weniger zytotoxisch aktiv als der Wildtyp (Abbildung 22A). Im parallel durchgeführten MTT-Assay zeigte sich, dass etwas weniger Wildtypzellen im Vergleich zu den LEC-CARs eingesetzt wurden (Abbildung 22B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der SRCL LEC-CAR schon in niedrigen Ratios besser als der Wildtyp und spezifisch gegen die Zelllinien Molm13 und HL-60 zytotoxisch aktiv ist. Diese Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchsdurchführungen bestätigt (s. Anhang 15 und Anhang 16).



Da der SRCL LEC-CAR schon beim Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:1 eine hohe Zytotoxizität von etwa 80% gegenüber Molm13 und HL-60 aufwies und diese bei höheren Effektor:Zielzell-Verhältnissen nicht relevant anstieg, wurden im Folgenden auch niedrigere Ratios unter eins eingesetzt (Effektor-Zielzell-Verhältnis von 0,1:1 und 0,5:1), um die spezifische Aktivierung des SRCL LEC-CARs weiter zu testen (Abbildung 23). Das zytotoxische Niveau fiel in diesem Versuch im Vergleich mit Abbildung 22 bei der Ratio 1:1 insgesamt geringer aus (max. 50%), sowohl gegenüber Molm13 und HL-60 als auch gegenüber der CAR-unabhängigen Kontrolle K562. Trotzdem zeigte sich hier eine Steigerung der Zytotoxizität des SRCL LEC-CAR zwischen den Ratios 0,1:1 und 0,5:1 gegenüber den Lewis X-positiven Zelllinien Molm13 und HL-60 (von je 16% auf 33% und 17% auf 34% Lyse), die Zytotoxizität war dabei – wie bereits zuvor beobachtet – signifikant im Vergleich mit dem Wildtyp erhöht. Allerdings bewirkte der SRCL LEC-CAR auch eine signifikant erhöhte Lyse der Lewis X-negativen Zelllinie OCI-M1 in den Ratios 0,5:1 und 1:1 (jeweils 19% und 10% höhere Lyse als der Wildtyp). Der SRCL LEC-CAR mit Linker zeigte

erneut keine spezifische Zytotoxizität (Abbildung 23A). Im begleitenden MTT-Versuch zeigte sich eine leicht reduzierte Anzahl von Wildtyp NK92-Zellen im Vergleich zu den beiden LEC-CARs eingesetzt wurden (Abbildung 23B).

A

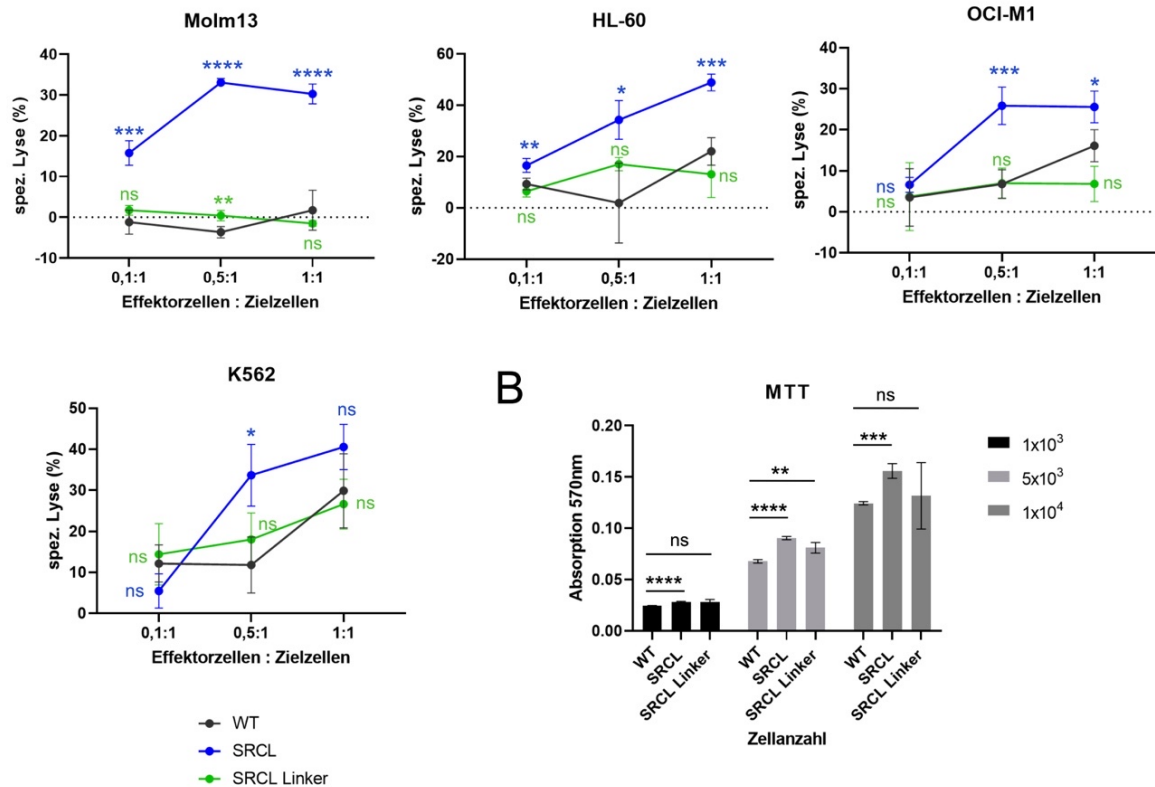


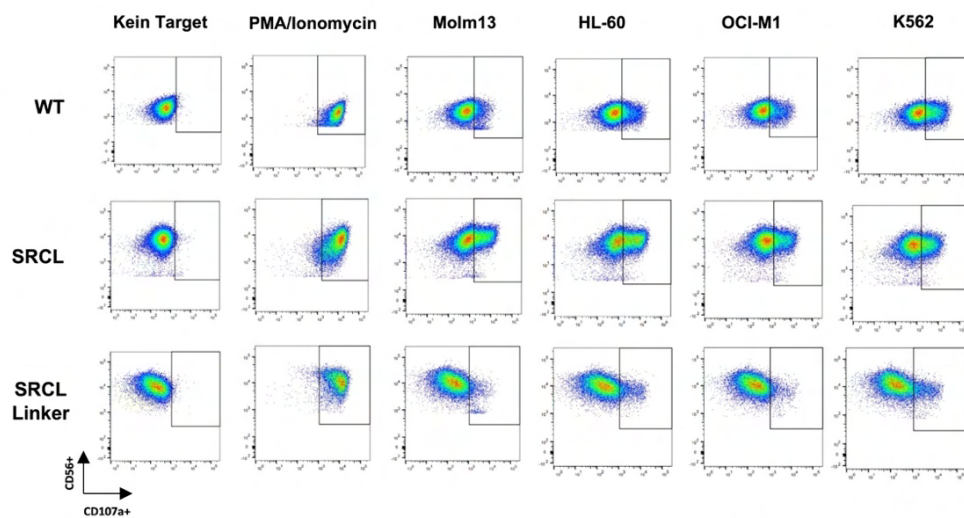
Abbildung 23 Zytotoxizität und MTT-Assay von SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker in niedrigen Effektor-Zielzell-Ratios ≤ 1 . (A) Wildtyp und SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in den angegebenen Effektor-Zielzell-Ratios ≤ 1 mit den Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens Triplikaten, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns = nicht signifikant

3.4.4 Degranulation des SRCL LEC-CARs mit und ohne Linker

Die Analyse der Degranulation ist eine weitere Methode, die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu untersuchen. Dabei wird die Oberflächenexpression von CD107a (synonym Lysosomal-assoziiertes Membranprotein-1, LAMP-1) bestimmt, das durch die Fusion der zytotoxischen Granula mit der Plasmamembran auf die Zelloberfläche gerät. Die NK92-Zellen wurden dafür über Nacht mit humanen IL-2 stimuliert und anschließend mit den Zelllinien Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 für drei Stunden inkubiert. PMA/Ionomycin wurde als Kontrolle der maximalen Degranulation verwendet. In Abbildung 24 ist die Expression von CD107a auf den Effektorzellen dargestellt. Nach Inkubation mit Molm13

und HL-60 kam es bei den SRCL LEC-CAR tragenden NK92-Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu einer um mindestens 20% stärkeren Degranulation. Dieser Unterschied machte gegenüber der Lewis X-negativen Kontrolle OCI-M1 nur 5% aus. Die Degranulation gegenüber K562-Zellen war vergleichbar. Passend zu den Ergebnissen aus den Zytotoxizitäts-Versuchen zeigte der SRCL LEC-CAR Linker keine Aktivierung durch Inkubation mit den Zielzellen und die Degranulation lag deutlich unter dem Niveau des Wildtyps. Die signifikant erhöhte Degranulation des SRCL LEC-CAR gegenüber Molm13 und HL-60 im Vergleich mit dem Wildtyp konnte in einer weiteren unabhängigen Versuchsdurchführung (s. Anhang 17) bestätigt werden.

A



B

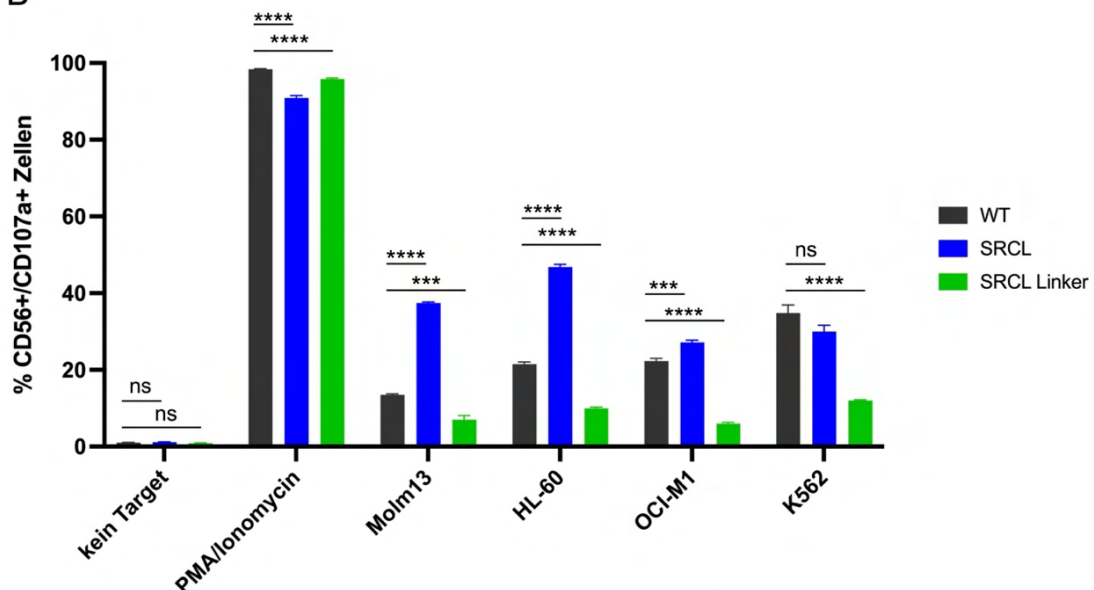


Abbildung 24 Degranulation der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker. (A) Die CD107a-Expression auf der Oberfläche der Wildtyp, mit SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen (CD56-positiv) wurde durchflusszytometrisch nach IL-2 Stimulation über Nacht und dreistündiger Inkubation mit Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 bestimmt. Effektorzellen mit Inkubation von Medium (kein Target) und

PMA/Ionomycin dienten als Kontrollen für die minimale und maximale Degranulation. Gezeigt ist je ein beispielhaftes FACS-Plot aus Triplikaten eines Experiments von insgesamt zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. (B) Analyse der Degranulation der CD56-positiven, CD107a-positiven Effektorzellen in Prozent. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (Balken stellen Mittelwerte von Triplikaten dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes). Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

3.4.5 IFN γ -Freisetzung des SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker

Durch die Messung der IFN γ -Freisetzung nach Inkubation mit den Zielzellen kann die anti-tumorale Aktivität der Effektorzellen weiter analysiert werden. IFN γ ist ein Zytokin, das u.a. von NK-Zellen nach Antigenbindung freigesetzt wird und vielfältige immunstimulatorische Effekte hat. Daher wurde abschließend die IFN γ -Freisetzung der NK92-Zellen im Überstand nach Inkubation mit den Zielzellen Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 über Nacht gemessen. Der SRCL LEC-CAR zeigte eine starke IFN γ -Freisetzung bei Inkubation mit Molm13 und HL-60 (je ca. 220 und 1120 pg/ml IFN γ , der Wildtyp im Vergleich je ca. 20 und 80 pg/ml IFN γ), während die Freisetzung gegenüber den Lewis X-negativen OCI-M1 deutlich geringer (ca. 80 pg/ml IFN γ) und auf einem ähnlichen Niveau mit dem Wildtyp ausfiel (ca. 50 pg/ml IFN γ). Erneut konnte kein Effekt für den SRCL LEC-CAR Linker beobachtet werden. Die CAR-unabhängige Kontrolle K562 führte zu einer gleich niedrigen Freisetzung des Zytokins zwischen Wildtyp und CAR-tragenden NK92. Nach maximaler Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigte der Wildtyp eine deutlich geringere Aktivierung (Abbildung 25). Die signifikant erhöhte IFN γ -Freisetzung des SRCL LEC-CAR gegenüber Molm13 und HL-60 im Vergleich mit dem Wildtyp konnte in einer weiteren unabhängigen Versuchsdurchführung (s. Anhang 18) bestätigt werden.

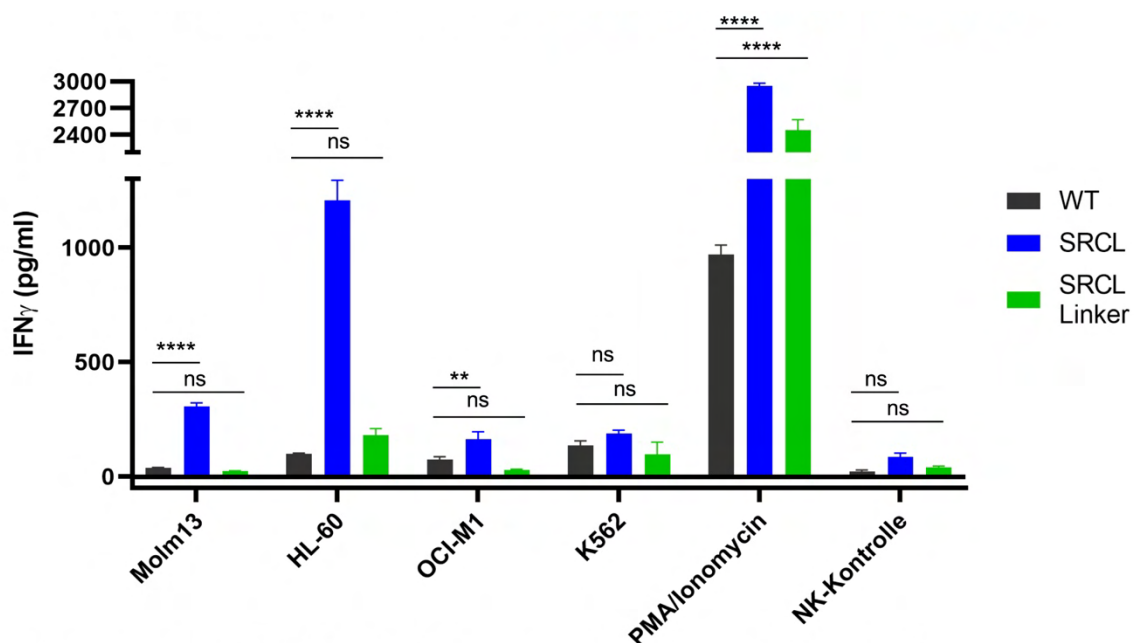


Abbildung 25 IFN γ -Freisetzung der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker. Die IFN γ -Freisetzung wurde im Überstand nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und Inkubation der Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen mit Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 über 22 Stunden bestimmt. PMA/Ionomycin diente als Kontrolle für die maximale IFN γ -Freisetzung und NK-Zellen ohne Zielzellen als Kontrolle für die minimale IFN γ -Freisetzung. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (Balken stellen Mittelwerte von Triplikaten dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes). Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

Es lässt sich zusammenfassen, dass keinerlei Funktion der kombinierten Fusions-LEC-CARs, der einzelnen CARs mit Linker und dem Siglec7 LEC-CAR ohne Linker in der Testung der Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion gegenüber verschiedenen Leukämiezelllinien festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu führt der SRCL LEC-CAR ohne Linker in NK92-Zellen zu einer signifikant erhöhten und spezifischen Zytotoxizität gegenüber Lewis X-positiven Leukämiezellen. Dieser Befund konnte zusätzlich durch eine vermehrte Degranulation und IFN γ -Produktion bestätigt werden.

3.5 Zytotoxische Aktivität des SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker gegenüber der Brustkrebszelllinie KPL-1

Zum Schluss wurde die zytotoxische Aktivität des SRCL LEC-CARs gegenüber einer soliden Tumorentität überprüft. Die Brustkrebs-Zelllinie KPL-1 wurde dafür analog zu den bisherigen Oberflächenglykosylierungs-Analysen durchflusszytometrisch auf die Bindung der Lektine SRCL und Siglec7 hin untersucht. Dabei zeigte nur SRCL eine spezifische Bindung an KPL-1 (Abbildung 26A).

Daraufhin wurde die Zytotoxizität des SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker im Vergleich mit dem Wildtyp NK92 gegenüber KPL-1 untersucht. K562 diente erneut als CAR-unabhängige Positiv-Kontrolle. Die Effektorzellen wurden 48 und 24 Stunden vorher mit humanen IL-2 stimuliert und in verschiedenen Effektor:Zielzell-Verhältnissen von 1:1, 5:1 und 10:1 eingesetzt. Der SRCL-LEC-CAR ohne Linker zeigte eine um etwa 30% höhere Zytotoxizität gegenüber der Lewis X-positiven Zelllinie KPL-1 als der SRCL LEC-CAR Linker. Verglichen mit dem Wildtyp, der ca. maximal 10% der KPL-1-Zellen lysierte, betrug der Unterschied etwa 40-50%. Beide CAR-tragenden Effektorzellen zeigten eine ansteigende Zytotoxizität mit zunehmendem Effektor:Zielzell-Verhältnis. Die Effizienz der drei getesteten Effektorzelllinien gegenüber der Positivkontrolle K562 war ähnlich hoch (Abbildung 26B). Der begleitende MTT-Versuch zeigte, dass etwas weniger Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den CAR-tragenden Zellen eingesetzt wurden. Innerhalb der CAR-tragenden Zellen wurden etwas mehr Effektorzellen mit Linker als ohne eingesetzt (Abbildung 26C).

Anschließend wurde die zytotoxische Degranulation der Effektorzellen gegenüber der Brustkrebszelllinie untersucht. Die NK92-Zellen wurden über Nacht mit humanen IL-2 stimuliert und anschließend mit KPL-1 für drei Stunden inkubiert. PMA/Ionomycin diente als Kontrolle der maximalen und K562 als Kontrolle der CAR-unabhängigen Degranulation. Abbildung 26D zeigt die Expression von CD107a der CD56-positiven Effektorzellen. Nach Inkubation mit der Lewis X-positiven Zelllinie KPL-1 ergab sich eine starke Zunahme der Expression von CD107a um etwa 40% auf den SRCL LEC-CAR tragenden NK92-Zellen – im Gegensatz zu den Wildtyp und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen, die lediglich eine CD107a-Expression von etwa 5% nach Inkubation mit den Zielzellen zeigten. K562-Zellen konnten den Wildtyp und den SRCL-LEC CAR im gleichen Maße aktivieren, der SRCL LEC-CAR Linker reagierte weniger stark.

Im letzten Schritt wurde die IFN γ -Freisetzung der Effektorzellen im Überstand nach Inkubation mit KPL-1 und K562 über Nacht gemessen. Der SRCL LEC-CAR demonstrierte eine starke IFN γ -Freisetzung mit etwa 700 pg/ml bei Inkubation mit KPL-1. Dieser Effekt war für den SRCL LEC-CAR Linker und für den Wildtyp hingegen nicht zu beobachten (keine IFN γ -Freisetzung). K562 führte zu einer gleich starken IFN γ -Produktion des Wildtyps und der CAR-tragenden NK92. Der SRCL LEC-CAR wurde durch Stimulation mit PMA/Ionomycin am stärksten aktiviert, der Wildtyp wurde deutlich geringer aktiviert (Abbildung 26E).

Zusammenfassend ist der SRCL LEC-CAR ohne Linker in NK92-Zellen auch gegenüber einer soliden Tumorzelllinie, der Lewis X-positiven Brustkrebszelllinie KPL-1, signifikant und spezifisch zytotoxisch aktiv. Bestätigt wurde dies durch eine vermehrte Degranulation und IFN γ -Freisetzung. Der SRCL LEC-CAR mit Linker zeigte zwar ebenfalls in geringerem Maße eine Zytotoxizität gegenüber KPL-1, allerdings ohne begleitende spezifische Degranulation und IFN γ -Freisetzung. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren unabhängigen Testung der Zytotoxizität, der Degranulation und IFN γ -Freisetzung bestätigt (s. Anhang 19).

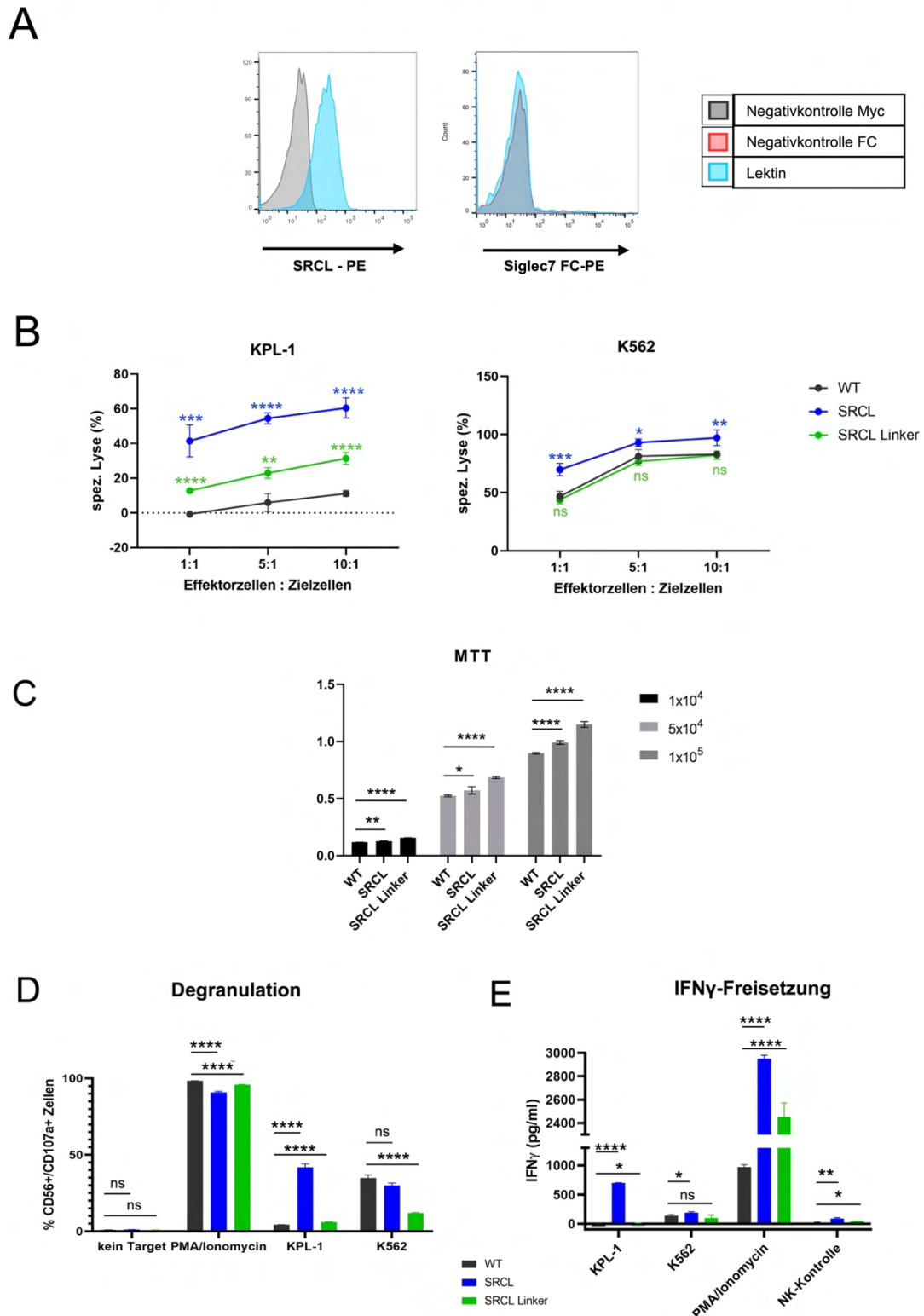


Abbildung 26 Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf der Zelllinie KPL-1 sowie Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Freisetzung des SRCL-LEC-CARs mit und ohne Linker gegenüber KPL-1. (A) Die Brustkrebszelllinie KPL-1 wurde durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenglykosylierung hin untersucht. Gezeigt ist die Bindung der Fluorophor-markierten Lektine SRCL und Siglec7 an die Zelloberfläche (grau: Negativkontrolle FC-Tag, rot: Negativkontrolle Myc-Tag, hellblau: Lektinbindung). (B) Wildtyp und SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in den angegebenen Effektor-Zielzell-Ratios mit den Calcein-gefärbten Zelllinien KPL-1 und K562 für vier Stunden inkubiert. (C) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. (D) Die CD107a-Expression auf der Oberfläche von Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen (CD65 positiv) wurde durchflusszytometrisch nach IL-2 Stimulation über Nacht

und dreistündiger Inkubation mit KPL-1 und K562 bestimmt. Effektorzellen mit Inkubation von Medium (kein Target) und PMA/Ionomycin dienten als Kontrollen für die minimale und maximale Degranulation. Gezeigt ist die Analyse der Degranulation der CD56-positiven, CD107a-positiven Effektorzellen in Prozent. (E) Die IFN γ -Freisetzung wurde im Überstand nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und Inkubation des Wildtyp, der SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen mit KPL-1 und K562 über 22 Stunden bestimmt. PMA/Ionomycin diente als Kontrolle für die maximale IFN γ -Freisetzung und NK-Zellen ohne Zielzellen als Kontrolle für die minimale IFN γ -Freisetzung. Dargestellt in B, C, D und E ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens Triplikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an. Die Standardabweichung ist nicht dargestellt, wenn diese kleiner als der Datenpunkt ist. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen mit Zellen des hämatopoetischen Systems gesunder Spender

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen (primäre pädiatrische und adulte Leukämieproben) im Vergleich mit peripheren Blutzellen und hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender mit zehn verschiedenen rekombinanten humanen Lektinen durchflusszytometrisch untersucht. Lektine zeigen als kohlenhydratbindende Proteine individuelle und spezifische Bindungsmuster gegenüber verschiedenen Glykanstrukturen, die über Glykan-Array Analysen ermittelt werden können und in der Einleitung in Abschnitt 1.4 für die jeweilig verwendeten Lektine beschrieben wurden. Damit können Glykosylierungsmuster auf der Zelloberfläche spezifisch durch Untersuchungen mit Lektinen bestimmt werden (Krishnamoorthy und Mahal 2009). Nach Untersuchung des Glykosylierungsprofils der Leukämiezellen im Vergleich mit gesunden Zellen konnten so direkt im Anschluss die vielversprechendsten Lektindomänen für die Generierung der (Fusions-)LEC-CARs ausgewählt werden.

Eine aberrante Expression von Glykanen tritt bei malignen hämatologischen Erkrankungen auf und führt u.a. zu veränderter Zell-Matrix-Interaktion, Immunmodulation, Invasion und Metastasierung. Gleichzeitig stellen diese veränderte Glykosylierungsmuster potentielle Angriffspunkte von Immuntherapien dar (Pang et al. 2018, Su et al. 2021).

In der Untersuchung der Oberflächenglykosylierung von sieben verschiedenen Leukämiezelllinien durch Dr. Anna-Katharina Franke zeigte sich, dass besonders Siglec7, Siglec9 und Siglec10 an die Zellen binden konnten. Dies deutet auf einen hohen Anteil sialylierter Glykane mit endständigen Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac sowie sulfatierten Sialinsäurehaltigen Strukturen und Neu5Gc- bzw. Neu5Ac(α 2-6)Gal-(β 1-4)-GlcNAc-Verbindungen hin. Die Bindung von DC-SIGN an alle Zelllinien stellt den Nachweis von N-glykosylierten Mannose-reichen Oligosacchariden und Lewis-Strukturen. Das Vorhandensein letzterer wird durch die Bindung von SRCL, welches Lewis X und Lewis A erkennt, auf den Zelllinien HL-60, Molm13 und OCI-AML3, und anteilig auch auf MV4-11, THP-1 und Kasumi-1, bestätigt.

Veränderungen in den Glykanstrukturen bei Leukämiezelllinien sind vorbeschrieben. Blöchl et al. haben die N- und O-Glykomik von 21 AML-Zelllinien (darunter die auch in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien HL-60, OCI-AML3, Molm13, MV4-11, THP-1 und Kasumi-1) mittels Chromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie untersucht. Passend zu den hier gezeigten durchflusszytometrischen Ergebnissen konnten die Autoren auf allen untersuchten Leukämiezelllinien reichlich N-glykosylierte Mannose-reiche Oligosaccharide (am häufigsten mit neun Mannose-Monomeren) nachweisen (Blöchl et al. 2021). Auch Ma

et al. hatte bereits in Zusammenhang mit Untersuchungen zur *Multiple-Drug Resistance* massenspektrometrisch nachgewiesen, dass Mannose-reiche Oligosaccharide reichlich auf der Zelllinie HL-60 vorkommen (Ma et al. 2015). (Sialyl-) Lewis X konnte in der Analyse von Blöchl et al. auf allen Zelllinien, besonders aber auf OCI-AML3, MV4-11, HL-60 und Molm13 und etwas weniger auch auf THP-1 und Kasumi-1 detektiert werden. Auch eine Hypersialylierung konnte bei allen Zelllinien beobachtet werden, besonders für α 2-3- und α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren (Blöchl et al. 2021). Wang et al. haben darüber hinaus die Glykomik-Profile von Glykosphingolipiden auf 19 verschiedenen AML-Zelllinien (darunter ebenfalls HL-60, OCI-AML3, Molm13, MV4-11, THP-1 und Kasumi-1) untersucht. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Expression von terminalen Lewis X und Lewis A Antigenen auf den Zelllinien Molm13 und HL-60 sowie eine vermehrte α 2-6-verknüpfte Sialylierung auf allen untersuchten Zelllinien (Wang et al. 2022). Diese Ergebnisse passen zu den hier gezeigten durchflusszytometrischen Untersuchungen mittels Lektinbindung.

Zu aberranten Glykosylierungsmustern von primären Leukämieproben (ALL, AML) liegen bisher weniger systematische Analysen vor (Pang et al. 2018, Su et al. 2021). Dabei wurden Untersuchungen mit Next-Generation Sequencing, Reverse-Transkriptase-PCR und durchflusszytometrische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt (Blöchl et al. 2023, Mondal et al. 2010, Lenkei et al. 1991). In wenigen Untersuchungen wurden auch einzelne Lektindomänen zur Untersuchung des Glykanprofils von primären Leukämieproben herangezogen (Gijzen et al. 2008, Mondal et al. 2010). Eine systematische Analyse der an der Zelloberfläche lokalisierten Glykanstrukturen von primären Leukämieproben (ALL und AML) mittels Bindung verschiedener Lektine per Durchflusszytometrie würde zusätzlich neue Erkenntnisse über potentielle Zielstrukturen für eine CAR-T-Zelltherapie ermöglichen und war daher Gegenstand dieser Arbeit. Dabei wurde gezeigt, dass es wichtig ist, nur frische primäre Proben zu verwenden, da aufgetaute Leukämieproben durch den Einfrierprozess eine Veränderung ihrer Oberflächenglykosylierung erfahren und dadurch keine belastbaren Daten zu generieren sind. Veränderungen der Oberflächenglykosylierung nach dem Einfrieren sind bei primären Leukämiezellen nicht vorbeschrieben. Generell gibt es nur wenige Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die Glykosylierung von humanen Proben im Rahmen des Einfrierens zum Lagern (Amez Martín et al. 2021). Fraglich ist dabei auch, ob die Temperaturunterschiede selbst ursächlich für die Veränderung der Glykosylierung sind – oder aber andere Substanzen, die beim Einfrierprozess verwendet werden (DMSO, FKS, RPMI-Medium). Um den Einfluss des Einfrierens systematisch zu untersuchen und damit optimale Lagerbedingungen für eine Vergleichbarkeit bei der Untersuchung der

Glykosylierung von eingefrorenen und frischen Leukämieproben zu gewährleisten, sind Studien mit größeren Probenanzahlen notwendig.

In dieser Arbeit wurden vier pädiatrische und fünf adulte primäre Leukämieproben (ALL und AML) untersucht. CD301 konnte an keine der Patientenproben binden, was gegen das Vorliegen vom Tn- und STn-Antigen auf den Leukämiezellen spricht.

Lenkei et al. haben die Expression von Lewis X auf pädiatrischen B-ALL-Proben mittels monoklonalem Antikörper durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte Lewis X nur auf sieben von insgesamt 34 Patientenproben nachgewiesen werden und variierte dabei zwischen 22-61% positiven Blasten (Lenkei et al. 1991). Auch Gijzen et al. haben eine variable Expression von Lewis X auf pädiatrischen und adulten 21 B-ALL-Proben (0%-80%) und eine geringe Expression auf 17 T-ALL-Proben (0%-7%) mittels monoklonalem AK nachgewiesen (Gijzen et al. 2008). Die Expression von Lewis X auf adulten AML-Zellen wird zwischen 31% und 70% angegeben (Maynadié et al. 1997). In dieser Arbeit zeigte SRCL als Lewis X-bindendes Lektin eine schwache Bindung von 3,5% und 10,3% an die pädiatrischen B-ALL-Proben und eine Bindung von 4,3% an die T-ALL-Probe. Dies passt in das Bild der vorbeschriebenen heterogenen Expression von Lewis X auf ALL-Zellen, für weitere Analysen wären größere pädiatrische Stichproben zur Bestimmung der SRCL-Bindung notwendig. An die eine pädiatrische AML-Probe konnte SRCL nicht binden. Passend zu den vorbeschriebenen Ergebnissen zeigte SRCL eine stärkere Bindung an die adulten AML-Proben (6,9%-58,9%).

Gijzen et al. haben zusätzlich die Oberflächenglykosylierung durchflusszytometrisch mit rekombinantem DC-SIGN auf den oben beschriebenen ALL-Proben im Vergleich mit peripheren Blutzellen gesunder Spender untersucht. Gijzen et al. haben dafür DC-SIGN mit einem N-terminalen His-Tag, gekoppelt an fluoreszierende *Beads*, verwendet. Es zeigte sich eine, verglichen mit gesunden Zellen, erhöhte Bindung von DC-SIGN an die Leukämiezellen – im gleichen Maße auf B- und T-ALL-Proben. Die DC-SIGN-Bindung korrelierte dabei nicht mit der Lewis X-Expression, was für das Vorliegen weiterer Glykane wie Mannose-reiche Oligosaccharide oder andere Lewis-Antigene spricht (Gijzen et al. 2008). In dieser Arbeit zeigte das rekombinante DC-SIGN mit FC-Tag nur eine schwache Bindung (2,4%-10,2%) an die allerdings deutlich kleinere Stichprobe von drei ALL-Proben, weshalb diese Untersuchung ausgeweitet werden sollte.

Mondal et al. haben mit rekombinantem Siglec2 durchflusszytometrisch auf pädiatrischen ALL-Proben (jeweils eine B- und T-ALL) im Vergleich mit Lymphozyten zweier gesunder Spender α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren analysiert. Mondal et al. haben für ihre Untersuchung – wie auch in dieser Arbeit – rekombinantes Siglec2 mit einem FC-Tag verwendet. Siglec2 zeigte dabei eine erhöhte Bindung an die untersuchten Leukämiezellen (T-ALL: 74,76%; B-ALL: 66,27%) (Mondal et al. 2010). Diese hohe Bindungsrate konnte in

dieser Arbeit nicht bestätigt werden (B-ALL: 13,6 und 2,3%; T-ALL: 10,6%). Hier sind zur Überprüfung deutlich größere Stichproben notwendig.

Siglec4a hat bis auf eine adulte AML-Probe an alle Leukämieproben mit hohem Anteil gebunden (51,8%-95,6%). Sowohl AML- als auch ALL-Zellen scheinen also reichlich Neu5Ac(α 2-3)Gal-haltige Glykanstrukturen auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren.

Bei den meisten hier untersuchten Proben (pädiatrisch und adult, AML und ALL) zeigte sich eine starke Bindung von über 90% von Siglec7, Siglec9 und Siglec10 an die Leukämieblasten. Dies weist einerseits auf eine Hypersialylierung (v.a. Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac-haltige, Neu5Gc- und Neu5Ac(α 2-6)Gal-(β 1-4)-GlcNAc-Verbindungen sowie Glykanstrukturen mit Neu5Ac(α 2-3)Gal gebunden an sulfatiertes und fucosyliertes GlcNAc) von AML- und ALL-Zellen hin. Andererseits bedeutet die starke Bindung an diese Kohlenhydratantigene, dass bei diesen Patienten mit nur einem einzigen Lektin-basierten CAR potentiell fast alle Blasten eliminiert werden könnten. Dies ist insbesondere in der CAR-Immuntherapie der AML wichtig, da dort eine sehr heterogene Expression von myeloiden Markern besteht und dadurch bisher kein AML-spezifischer Marker mit Expression auf allen Blasten gefunden werden konnte (im Gegensatz zur CD19 positiven B-ALL) (Acharya und Walter 2020). Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit eine hohe Varianz zwischen Proben der gleichen Unterform von Leukämien. So wies z.B. die pädiatrische cALL 1 eine Siglec10-Bindung von 98,7% und die andere pädiatrische cALL 2 nur eine Bindung von 2,3% auf. Die Leukämieblasten eines jeden Patienten müssten also individuell vor Start einer Lektin-basierten CAR-T-Zelltherapie auf ihr spezifisches Oberflächenglykosylierungsprofil hin untersucht werden.

Des Weiteren ergaben sich – bei jedoch kleiner Stichprobe – Unterschiede zwischen adulten und pädiatrischen Proben besonders bezüglich der Bindung von SRCL, welches präferentiell an adulte AML-Proben gebunden hat. Dies könnte daraufhin deuten, dass sich pädiatrische Tumore nicht nur in der Häufigkeit der Entitäten von adulten Tumoren unterscheiden, sondern auch hinsichtlich ihrer Oberflächenglykosylierung. Gesonderte und gezielte Forschung an pädiatrischen Tumoren ist daher essentiell für eine Verbesserung der spezifischen Therapiemöglichkeiten und Heilungsraten von Krebs bei Kindern (Kattner et al. 2019).

Insgesamt ist die hier untersuchte Stichprobe klein und heterogen (sowohl pädiatrische als auch adulte Proben, verschiedene Unterformen der Leukämie). Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass aufgrund der veränderten Oberflächenglykosylierung bei eingefrorenen Leukämieproben zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur frische Proben von Patienten des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet wurden. Deshalb sind größere, ggf. multizentrische Analysen der Oberflächenglykosylierung mittels Lektinen von primären, frischen Leukämieproben nötig, um die hier gefundenen Ergebnisse bezüglich

der verschiedenen Untergruppen von Leukämien zu bestätigen und genauer zu analysieren.

Ein limitierendes Problem von CAR-T-Zelltherapien stellt die durch überlappende Antigenexpression zwischen Leukämiezellen und normalen hämatopoetischen Zellen bedingte Hämatotoxizität dar – insbesondere bei der AML (Acharya und Walter 2020). Zum Vergleich der Oberflächenglykosylierung von Leukämiezellen wurden daher ebenfalls Zellen des hämatopoetischen Systems gesunder Blut- und Knochenmarksspender untersucht. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den primären Leukämieproben wurden ebenfalls nur frische Proben zur Untersuchung verwendet.

CD301 zeigte keine Bindung an periphere Blutzellen (Prasse et al. 2024). Ebenso ergab sich kein relevanter Nachweis der Liganden von Siglec2, Siglec3 und Siglec5. SRCL und DC-SIGN hingegen haben vor allem an Granulozyten gebunden. Bei Siglec4a, Siglec7, Siglec9 und Siglec10 ergaben sich heterogene Bindungsmuster an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die Oberflächensialylierung von normalen peripheren Blutzellen scheint also Spender-individuell zu sein, jedoch bezüglich Siglec7, Siglec9 und Siglec10 insgesamt niedriger ausgeprägt als auf den meisten Leukämiezellen.

Falls periphere Blutzellen aufgrund einer überlappenden Glykanexpression durch eine CAR-Immuntherapie eliminiert würden, wäre dies tolerabel, solange die Blutzellen aus den hämatopoetischen Stammzellen nachgebildet werden können. Daher wurde ebenfalls die Oberflächenglykosylierung von CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark dreier gesunder Spender untersucht. Hier zeigte sich eine relevante Bindung von Siglec7 und Siglec9 auf CD34⁺ und CD38⁺ Stammzellen, was auf eine Expression von Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac-haltigen Glykanen und Glykanstrukturen mit Neu5Ac(α 2-3)Gal gebunden an sulfatiertes und fucosyliertes GlcNAc hindeutet. Dieses spezifische Sialylierungsmuster fand sich auch auf den meisten Leukämiezellen. Siglec10 zeigte eine variable und interindividuell stark ausgeprägte Bindung an die Stammzellen, sodass in dieser kleinen Stichprobe keine eindeutige Aussage zum potentiellen Schutz der Stammzellen bei überlappender Antigenexpression möglich ist. SRCL hingegen zeigte im Gegensatz zur Bindung an die Leukämiezellen und normalen Granulozyten keine relevante Bindung an die hämatopoetischen Stammzellen. Dies bedeutet, dass sich SRCL als Einzel-CAR für eine Immuntherapie aufgrund einer vergleichsweise geringen Hämatotoxizität eignen würde. Dies gilt aufgrund der überlappenden Antigenexpression nicht im gleichen Maße für Siglec7 und Siglec9, obwohl deren Liganden deutlich stärker als Lewis X auf der Oberfläche von Leukämiezellen zu finden waren. Daher könnte sich hier die Kombination der Lektindomänen von Siglec7 und SRCL in einem Fusions-CAR als besonders wirksam und

schützend auf die Stammzellen erweisen, solange die Zytotoxizität der CAR-Zellen erst nach Bindung beider Domänen ausgelöst wird.

Insgesamt ist die hier untersuchte Stichprobe mit sieben Blutspendern und drei Knochenmarksspendern klein und sollte in größeren Studien überprüft werden.

4.2 Klonierung, Oberflächennachweis und Bindungseigenschaften der LEC-CARs

Auf Grundlage der Ergebnisse von der Untersuchung der Oberflächenglykosylierung wurden für die Generierung von Fusions-LEC-CARs die beiden Lektine SRCL und Siglec7 ausgewählt. Siglec7 zeigte eine sehr starke Bindung an pädiatrische und adulte Proben sowie an AML, cALL und T-ALL Proben und verspricht damit eine Abdeckung verschiedener Leukämieformen. SRCL war das vielversprechendste C-Typ-Lektin mit hier nachgewiesener Bindung vor allem auf adulten AML-Proben und in der Literatur vorgeschriebener Expression von Lewis X auf primären AML- und ALL-Blasten (Lenkei et al. 1991, Maynadié et al. 1997, Gijzen et al. 2008). Außerdem war die Bindung der beiden Lektine auf einigen Leukämiezelllinien stark positiv und auf anderen Leukämiezelllinien negativ, sodass sich die beiden Lektine gut für funktionelle Experimente gegen Zelllinien eignen. Für die Kombination zweier verschiedener Lektinklassen (C-Typ und I-Typ Lektine) wurden daher SRCL und Siglec7 in einem Fusions-LEC-CAR in dieser Arbeit miteinander kombiniert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten zwei Antigenbindungsdomänen in einem CAR zu kombinieren. In dieser Arbeit wurde das Prinzip eines sogenannten Tandem-CARs gewählt, in dem zwei verschiedene Antigen-bindende Domänen direkt über einen Linker in einem einzigen CAR-Konstrukt kombiniert werden (Hartmann et al. 2017). Dafür wurden die beiden Lektin-Domänen jeweils in den beiden möglichen Reihenfolgen hintereinandergeschaltet kombiniert. Zusätzlich wurden beide Domänen als einzelne CARs für den direkten Vergleich zwischen Fusions- und Einzel-CARs als Kontrolle kloniert. Insgesamt wurden drei verschiedene Versionen aller dieser Fusions- und Einzel-LEC-CARs generiert: LEC-CAR, LEC-CAR Linker und LEC-CAR Linker Myc. In der Version LEC-CAR Linker wurde zusätzlich ein Glycin-Serin-Linker zwischen der CRD und der IgG1-Domäne eingefügt, um eine erhöhte Flexibilität und damit Bindungsfähigkeit der Lektin-Domänen zu ermöglichen.

Der zusätzliche Nachweis der Bindungsfähigkeit der Lektindomänen ist wichtig, da die Expression von GFP oder der Nachweis des Myc-Tags bzw. der Lektindomäne mit monoklonalen Antikörpern keine Aussage darüber zulässt.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften der LEC-CAR Linker Konstrukte zeigte zwar eine geringfügig bessere Bindung vom SRCL LEC-CAR mit Linker an seinen Liganden

Lewis X als in der Version ohne Linker. In der funktionellen Testung der Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion gegenüber Leukämiezellen zeigte sich allerdings in allen Bereichen eine signifikante Verschlechterung durch den Linker. Interessanterweise hatte derselbe (G₄S)₃-Linker zwischen der CRD und der IgG1-Domäne im Lektin-basierten CAR mit der CRD von CD301 von Franke et al. aus unserer Arbeitsgruppe einen positiven Effekt auf die funktionelle Testung des CARs. Der Glycin-Serin-Linker führte im Vergleich mit dem CD301-CAR ohne Linker zu einer verbesserten Bindung der CD301-Liganden Tn und STn, ähnlich der verbesserten Bindung von SRCL mit Linker an seinen Liganden Lewis X. Allerdings führte der Linker im CD301 CAR im direkten Vergleich auch zu einer signifikant erhöhten und spezifischen Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion gegenüber verschiedenen Tn- und STn-positiven Brustkrebszelllinien. Bei der CRD von CD301 hatte der Linker also keinen negativen Einfluss auf die Signalweiterleitung und bewirkte eine erhöhte Flexibilität und damit vermutlich auch eine verbesserte Bindung von weiter entfernten oder schlechter zugänglichen CD301-Liganden (Franke et al. 2023). Obwohl in dem CD301-CAR von Franke et al. bis auf den Austausch der CRD (CD301 statt SRCL) dasselbe CAR-Rückgrat verwendet wurde und CD301 und SRCL beide C-Typ Lektine darstellen, zeigten sich unterschiedliche Effekte. Damit scheint der zusätzlich eingebaute Glycin-Serin-Linker nicht für alle C-Typ CRDs in Lektin-basierten CARs im gleichen Maße geeignet zu sein.

In der Version LEC-CAR Linker Myc wurde zusätzlich ein an der Lektin-Domäne terminal gelegener Myc-Tag zum durchflusszytometrischen Nachweis der LEC-CARs an der Zelloberfläche eingebaut. Der Myc-Tag ließ sich allerdings nur an der Siglec7-Domäne nachweisen (sowohl im Einzel- als auch im Fusions-CAR mit terminaler Siglec7-Domäne). Im Gegensatz dazu konnte der Myc-Tag an der SRCL-Domäne weder im Einzel- noch Fusions-CAR nachgewiesen werden, obwohl der SRCL-Siglec7 LEC-CAR und der SRCL LEC-CAR fähig waren, spezifisch Lewis X zu binden und damit indirekt an der Zelloberfläche nachgewiesen wurden. Konträr hierzu konnte der ebenfalls terminal eingebaute Myc-Tag an der C-Typ CRD des CD301-Linker-Myc-CAR von Franke et al. durchflusszytometrisch mittels desselben wie in dieser Arbeit verwendeten Anti-Myc Antikörper nachgewiesen werden – zusätzlich zur nachgewiesenen Bindungsfähigkeit gegenüber seinen Kohlenhydratliganden (Franke et al. 2023). Dies zeigt, dass der Myc-Tag nicht für alle CRDs von C-Typ Lektinen in CARs geeignet ist und sterisch verdeckt werden kann.

Auch die Anordnung der beiden Lektindomänen im Fusions-LEC-CAR hat einen Einfluss auf die Faltung und Bindungsfähigkeit, denn im Gegensatz zum SRCL-Siglec7 war der Siglec7-SRCL LEC-CAR unabhängig vom Linker nicht in der Lage, Lewis X mit der SRCL-Domäne zu binden.

Obwohl die Siglec7-Domäne sowohl mit dem Anti-Myc-Antikörper im Einzel- und auch im Fusions-CAR an terminaler Position und auch mit dem anti-Siglec7-Antikörper in beiden Kombinationen des Fusions-CARs und im Einzel-CAR an der Zelloberfläche nachgewiesen wurde, konnte die Siglec7-Domäne in der Untersuchung der Bindungseigenschaften nicht an die sialylierten Kohlenhydratantigene (Neu5AC)₃ und 6'SLN binden. Die Siglec7-Domäne scheint also, ob mit oder ohne Linker, in allen hier untersuchten LEC-CARs nicht bindungsfähig zu sein.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit existierte kein frei verkäuflicher Antikörper, der sich gegen die CRD von SRCL richtet. Durch den Nachweis der Bindungsfähigkeit der SRCL-Domäne an PAA-gebundenes Lewis X konnte hier gezeigt werden, dass die Verwendung des synthetischen Kohlenhydratantigens für den spezifischen Nachweis der CRD von SRCL an der Zelloberfläche geeignet ist.

4.3 Möglichkeiten und Limitationen von Fusions-LEC-CARs

Die Fusion von zwei Antigen-bindenden Domänen in einem kombinierten CAR kann zu einer höheren Spezifität und damit erhöhten Sicherheit durch geringere *on-target/off-tumor* Toxizität von CAR-Immuntherapien führen. Dies ist insbesondere bei der AML wichtig, da im Gegensatz zu den bereits zugelassenen CD19-CAR-T-Zelltherapien bei der B-ALL noch kein rein AML-spezifisches Antigen gefunden werden konnte, das auf allen malignen Zellen inklusive der Leukämienstammzellen, aber nicht auf lebenswichtigen gesunden Zellen exprimiert wird (Acharya und Walter 2020). Deshalb könnte durch die Kombination von zwei verschiedenen Antigen-bindenden Domänen die Elimination aller Leukämieblasten unter Schonung von gesunden Zellen mit Fusions-CAR-T-Zellen erreicht werden. Bei CAR-T-Zelltherapien kann es durch den Verlust der Expression des Zielantigens zu einem *Immunescape* der Tumorzellen kommen. So kann es beispielsweise bei einer CD19-CAR-T-Zelltherapie über die klonale Expansion eines CD19-negativen Tumorzellklons zum Wirkverlust und damit zum Rezidiv der Erkrankung kommen. Durch den Einsatz von Fusions-CAR-T-Zellen (z.B. CD20-CD19-CARs) könnte dieses Risiko reduziert werden (Tong et al. 2020, Shah et al. 2020), allerdings fehlen bisher größere klinische Vergleichsstudien. Zusätzlich könnte gerade bei der Verwendung von Lektin-Domänen aufgrund der im Vergleich mit Antikörper-Antigen-Bindungen schwächeren Bindung zwischen Lektin und Kohlenhydratantigen (Cummings et al. 2015) die Avidität und zytotoxische Effizienz der Effektorzellen durch Kombination von zwei CRDs in Fusions-LEC-CARs weiter gesteigert werden.

Aufgrund dieser möglichen Vorteile wurden in dieser Arbeit verschiedene Fusions-LEC-CARs entwickelt und getestet. Dafür wurde das Konzept des Tandem-CARs gewählt. Der *Proof-of-concept* Tandem-CAR wurde von Grada et al. entwickelt und richtet sich als AK-basierter Zweitgenerations-CAR bispezifisch gegen CD19 und den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*Human epidermal growth factor*, HER2). Dieser Tandem-CAR zeigt eine spezifische Zytotoxizität gegen jeweils nur CD19 oder HER2-positive Zielzellen und eine relevante synergistische Steigerung der Zytotoxizität bei gleichzeitiger Expression beider Antigene auf den Zielzellen (Grada et al. 2013). Mittlerweile wurden weitere Tandem-CARs entwickelt und bereits klinisch in der Therapie von malignen B-Zell-Erkrankungen getestet (Shah et al. 2020, Tong et al. 2020). Obwohl in dieser Arbeit die Fusion von zwei verschiedenen Lektindomänen in einem Tandem-CAR-Konstrukt möglich war und zumindest beim SRCL-Siglec7 LEC-CAR die Siglec7-Domäne mittels Antikörper-Bindung an der NK92-Zelloberfläche nachgewiesen und die SRCL-Domäne seinen Kohlenhydratliganden Lewis X auch spezifisch binden konnte, zeigte sich keinerlei Funktion in der Testung der Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion gegenüber verschiedenen Leukämiezelllinien. Dies gilt genauso für die anderen Fusions-LEC-CARs unabhängig von den Anordnungen der beiden Domänen und den eingesetzten Linkern. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene flexible dreifache Glycin-Serin-Linker zur Trennung der CRDs von Siglec7 und SRCL in den Fusions-LEC-CARs verwendet: (GGSG)₃ mit 36 Basenpaaren und (G4S)₃ mit 45 Basenpaaren. Glycin-Serin-Linker zur Trennung der beiden Antigen-bindenden Domänen in Tandem-CARs werden auch von anderen Autoren verwendet. Dabei variiert allerdings die Länge der Linker, so verwendet beispielsweise Tong et al. einen vierfachen Glycin-Serin-Linker (G4S)₄ (Tong et al. 2020), Shah et al. hingegen einen fünffachen Glycin-Serin-Linker (G4S)₅ (Shah et al. 2020). Die Verwendung eines vier- oder fünffachen Glycin-Serin-Linkers zwischen den beiden CRDs von Siglec7 und SRCL in den Fusions-LEC-CARs könnte dazu führen, dass eine gleichzeitige Ligandenbindung durch eine erhöhte Flexibilität zwischen den Domänen möglich wird. Diese erhöhte Flexibilität könnte allerdings auch von Nachteil sein. Ma et al. haben zwei verschiedene Linker (einen vierfachen Glycin-Serin-Linker (G4S)₄ und einen dreifachen (EAAAK)₃-Linker) in ihren Tandem-CARs mit den Domänen von CD19 und CD22 im Vergleich untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Tandem-CARs, bei denen die beiden Domänen durch den (EAAAK)₃-Linker statt dem Glycin-Serin-Linker getrennt wurden, eine signifikant höhere Zytotoxizität und Zytokin-Sekretion *in vitro* aufwiesen. Die Autoren machen dafür die stabile spiralförmige und damit starre Struktur des (EAAAK)₃-Linkers verantwortlich, wodurch die beiden Domänen im Tandem-CAR besser als bei Verwendung des flexiblen Glycin-Serin-Linkers auseinandergehalten werden und sich gegenseitig nicht in ihrer Bindungsfähigkeit beeinträchtigen (Ma et al. 2024). Dieses Phänomen könnte auch

für die Fusions-LEC-CARs relevant sein, denn der Siglec7-SRCL LEC-CAR konnte im Gegensatz zum SRCL-Siglec7 LEC-CAR Lewis X mit der SRCL-Domäne nicht binden. Deshalb wäre es sinnvoll, in weiteren Experimenten im direkten Vergleich zu testen, ob die Fusions-LEC-CARs durch mehrfache Glycin-Serin-Linker von einer erhöhten oder durch einen (EAAAK)₃-Linker von einer verringerten Flexibilität profitieren würden.

Eine relevante Beeinflussung der Zytotoxizität der Effektorzellen durch die Transduktion und Sortierung als Grund für die fehlende Funktionalität der Fusions-LEC-CARs konnte ausgeschlossen werden, da die Positivkontrolle mit K562-Zellen in den Zytotoxizitätsversuchen ein ausreichend hohes Killing aller LEC-CAR-Zellen auf einem Niveau mit dem Wildtyp zeigte. Lediglich der SRCL-Siglec7 LEC-CAR zeigte eine geringere Zytotoxizität, sowohl gegenüber K562 als auch gegenüber allen anderen Leukämiezelllinien. Ursächlich hierfür könnte theoretisch eine Bindung des CARs an die NK92-Zellen sein, die zum sogenannten Fraternizid und in Folge dessen während der Kultivierung zur Selektion von weniger zytotoxischen Zellklonen führt. Zum Nachweis der Expression der Liganden von SRCL und Siglec7 müsste die spezifische Oberflächenglykosylierung der NK92-Zellen analysiert werden. Ein Fraternizid scheint allerdings unwahrscheinlich, da sowohl beim Siglec7-SRCL Fusions-LEC-CAR als auch beim nachweislich spezifisch zytotoxisch aktivem einzelnen SRCL LEC-CAR die allgemeine Zytotoxizität nicht beeinträchtigt war.

Die zu den Fusions-LEC-CARs gehörige Einzelkontrolle des Siglec7 LEC-CARs konnte ebenfalls über den anti-Siglec7 Antikörper an der NK92-Zelloberfläche nachgewiesen werden, zeigte allerdings keine Bindung an seine Zuckerliganden und auch keine Funktion in den funktionellen Versuchen. Hier steht also zunächst die Optimierung der einzelnen Siglec7-Domäne im Vordergrund. Obwohl die SRCL-Domäne sowohl im einzelnen SRCL LEC-CAR als auch im SRCL-Siglec7 LEC-CAR den Liganden Lewis X spezifisch binden konnte, war nur der einzelne SRCL-LEC-CAR gegenüber Lewis X-positiven Leukämiezellen zytotoxisch aktiv. Dies zeigt, dass ein Tandem-CAR für die Kombination der SRCL-Domäne mit der Siglec7-Domäne nicht geeignet ist.

Da der einzelne SRCL LEC-CAR allerdings eine hohe spezifische Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Freisetzung gegenüber den Lewis X-positiven Zelllinien Molm13 und HL-60 zeigte, ergeben sich neue Kombinationsmöglichkeiten zur Verbesserung des Konzepts eines Fusions-CARs mit der SRCL-Domäne. Zum Erhalt der zytotoxischen Aktivität der SRCL-Domäne und um eine sterische Verdeckung der Domänen zu verhindern (denn der Siglec7-SRCL LEC-CAR war im Gegensatz zum SRCL-Siglec7 LEC-CAR nicht in der Lage, Lewis X mit seiner SRCL-Domäne zu binden), könnte statt der Kombination in einem Tandem-CAR eine Aufteilung der SRCL-Domäne und einer optimierten Siglec7-Domäne in einem konditionalen bispezifischen CAR erfolgen. In diesem Fall wird die T-

Zellaktivierung (z.B. CD3 ζ -Domäne) und Costimulation (z.B. CD28-Domäne) auf zwei CAR-Konstrukte aufgeteilt, die unterschiedliche Antigene erkennen. Im idealen Fall kommt es nur zu Auslösung der Zytotoxizität, wenn beide Liganden gleichzeitig gebunden werden („UND-Logikgatter“) (Hartmann et al. 2017, Abken 2021). Das stellt einen weiteren Vorteil von konditionalen CARs gegenüber Tandem-CARs dar, bei denen nicht zwangsläufig vorherzusehen ist, ob und wie stark die Zytotoxizität bereits bei Bindung eines der beiden Antigene ausgelöst wird („ODER-Logikgatter“). Ein striktes „ODER-Logikgatter“ von Tandem-CARs könnte sich dabei zwar positiv auf die Risikoreduktion eines *Immunescapes* der Tumorzellen, aber gegebenenfalls auch nachteilig auf die *on-target/off-tumor* Toxizität auswirken (Zah et al. 2016, Abken 2021). He et al. haben einen konditionalen bispezifischen CAR gegen CD13 und TIM-3 zur Behandlung der AML entwickelt. Dabei konnten die Autoren mit *in vitro* und *in vivo* Versuchen zeigen, dass duales Targeting gegen zwei verschiedene tumorassoziierte Antigene von AML-Blasten mittels ihres konditionalen CARs zu einer erhöhten Sicherheit durch geringere *on-target/off-tumor* Toxizität bei gleicher Effektivität im Vergleich mit dem Einzelkontroll-CAR führt (He et al. 2020). Ein konditionaler CAR mit den CRDs von Siglec7 und SRCL könnte also vorteilhaft im Vergleich zur Verwendung der gleichen Domänen in einem Tandem-CAR sein. Neben konditionalen CARs stellen auch SynNotch-gesteuerte CARs eine Möglichkeit für ein striktes „UND-Logikgatter“ bei dualem Antigen targeting dar. In diesem Fall induziert die Bindung eines ersten Antigens an den konstitutiv exprimierten SynNotch-Rezeptor auf der T-Zelle die Expression eines CARs, der spezifisch für ein zweites Tumorantigen ist. Erst nach Bindung dieses CARs an sein Antigen auf der Tumorzelle wird die T-Zelle zytotoxisch aktiv. Damit ist das gleichzeitige Vorhandensein beider Antigene in einem „UND-Logikgatter“ Bedingung zur Auslösung der Zytotoxizität (Roybal et al. 2016). Dieses Prinzip könnte auch auf ein duales Antigen targeting mit den CRDs von SRCL und Siglec7 übertragen werden und könnte durch die Aufteilung der beiden Domänen ebenfalls ein sterisches Verdecken der CRDs verhindern.

Statt zwei Lektindomänen wie SRCL und Siglec7 könnten alternativ auch eine Lektindomäne und ein scFv eines monoklonalen Antikörpers in einem Fusions-CAR miteinander kombiniert werden. Durch die im Vergleich mit Antikörper-Antigen-Bindungen geringere Affinität zwischen Lektin und Kohlenhydratantigen (Cummings et al. 2015) könnte die Kombination von einem Lektin mit einem Antikörper die Bindungsstabilität und -dauer des ganzen CAR-Konstrukts an die Leukämieblasten erhöhen. Zielantigene könnten weiterhin zwei verschiedene Kohlenhydratantigene sein, indem z.B. ein Lektindomänen-basierter CAR wie SRCL mit einem Antikörper-basierten CAR mit Spezifität für ein TACA, wie z.B. der Antikörper-basierte CAR gegen Lewis Y (Ritchie et al. 2013), kombiniert werden.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Kohlenhydratantigens und eines Proteinantigens als Zielstrukturen eines Fusions-CARs. Dafür könnte ein Lektin-basierter CAR wie der SRCL LEC-CAR mit einem Antikörper-basierten CAR gegen z.B. CD34 kombiniert werden. Dies würde dazu führen, dass die CD34-positiven und besonders Chemotherapie-resistenten leukämischen Stammzellen (Zahran et al. 2018) von der CAR-T-Zelltherapie erfasst würden und gleichzeitig die gesunden CD34-positiven aber hauptsächlich Lewis X-negativen Stammzellen geschont werden würden. Die Schonung von sensiblen Zellpopulationen ist besonders wichtig bei der AML, wo der Schutz der Stammzellen und myeloiden Progenitoren kritisch für den Erfolg einer CAR-T-Zelltherapie ist (Daver 2020).

Eine weitere Option zum Schutz von kritischen Zellpopulationen stellen sogenannte inhibitorische CAR-T-Zellen (iCAR-T-Zellen) mit einem „NICHT-Logikgatter“ dar. In diesem Fall exprimiert die T-Zelle zwei CARs mit verschiedener Wirkung: einen CAR mit aktivierender Signaldomäne (z.B. CD28-CD3 ζ) und einen CAR mit inhibitorischer Signaldomäne (z.B. vom *programmed cell death protein 1*, PD-1). Die iCAR-T-Zellen sind damit spezifisch zytotoxisch aktiv gegen Tumorzellen, die nur das Antigen des aktivierenden CARs exprimieren und verschonen gleichzeitig Zellen des Normalgewebes mit Co-Expression der Antigene des aktivierenden und inhibitorischen CARs (Mohanty et al. 2019). So könnte beispielsweise Siglec7 als aktivierender LEC-CAR mit CD34 als inhibitorischer CAR zum Schutz der Stammzellen bei einer CD34-negativen, aber Siglec7-positiven ALL kombiniert werden. Damit würden die Siglec7-CD34 iCAR-T-Zellen spezifisch die Siglec7-positiven, aber CD34-negativen ALL-Zellen durch Aktivität der mit Siglec7 verbundenen CD28-CD3 ζ -Signaldomäne eliminieren und gleichzeitig die Stammzellen mit Co-Expression von CD34 und Siglec7 durch die inhibitorische Wirkung der mit CD34 verbundenen Signaldomäne von PD-1 verschonen.

Die Verwendung von T-Zellen mit der Co-Expression von zwei vollständigen und unabhängigen CARs (Multi-CAR-T-Zellen) oder ein Pooling von verschiedenen CAR-T-Zellen in einem therapeutischen Produkt (Hartmann et al. 2017) hingegen scheint nicht sinnvoll, da keine Steuerungsmöglichkeiten bestehen und vor allem bei der AML damit der Vorteil der Schonung von Normalgewebe durch die Kombination von Zielantigenen entfällt.

4.4 Der Siglec7 LEC-CAR zeigt keine zytotoxische Aktivität gegenüber Leukämiezellen

Obwohl der einzelne Siglec7 LEC-CAR mittels Anti-Myc-Antikörper und Anti-Siglec7-Antikörper auf der Oberfläche der NK92-Zellen nachgewiesen werden konnte und die ausgewählten Ziel-Leukämiezelllinien Siglec7-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigte sich in der funktionellen Testung des CARs keine spezifische Zytotoxizität – auch

der zusätzlich eingebaute Linker zeigte keinen Effekt. Die allgemeine Zytotoxizität der NK92-Zellen war durch die Transduktion und Sortierung dabei nicht beeinträchtigt, da die Siglec7 LEC-CAR tragenden Effektorzellen die Positivkontrolle K562 im gleichen Maße wie der Wildtyp lysierte.

Ein Grund für das Nicht-Funktionieren des Siglec7 LEC-CARs könnte in der fehlenden Bindungsfähigkeit seiner Liganden liegen. Denn in der Untersuchung der Bindungseigenschaften konnte der Siglec7 LEC-CAR nicht an Kohlenhydratantigene mit terminaler Sialinsäure binden. Das könnte daran liegen, dass die alleinige Verwendung der V-set Domäne mit ihrer CRD von Siglec7 in einem CAR-Konstrukt nicht ausreichend für die richtige Faltung und damit Bindungsfähigkeit ist. Das Lektin Siglec7 beinhaltet extrazellulär neben der Sialinsäure-bindenden V-set Domäne noch zwei C2-set Immunglobulin-Domänen, welche einen ausreichenden Abstand zwischen der CRD und Plasmamembran gewährleisten (Yamakawa et al. 2020). Da der Siglec7 LEC-CAR allerdings auch in der Version mit dem zusätzlich eingebauten dreifachen Glycin-Serin-Linker zwischen CRD und IgG1-Domäne keine Ligandenbindung und keine Zytotoxizität zeigte, scheint der durch diesen Linker erhöhte Abstand zwischen CRD und Plasmamembran und eine gegebenenfalls erhöhte Flexibilität weiterhin nicht ausreichend zu sein.

Neben dem Einsatz eines Linkers für eine verbesserte Ligandenbindung besteht eine andere Möglichkeit darin, mehr als nur die CRD von Siglec7 in das CAR-Konstrukt zu übernehmen. Diese Option wurde von Meril et al. näher untersucht. Um zu testen, welche der drei extrazellulären Domänen (V-set Domäne plus die zwei C2-set Domänen) von Siglec7 essentiell für die Funktion eines Siglec7-basierten CARs ist, haben die Autoren vier unterschiedliche CARs entwickelt: einen mit der gesamten extrazellulären Domäne von Siglec7 (S7), einen mit nur der V-set Domäne (S7(D1)), einen mit der V-set und der ersten C2-set Domäne (S7(D1+2)) und einen mit der V-set und zweiten C2-set Domäne (S7(D1+3)). Der S7 und S7(D1+3) CAR zeigten ähnlich hohe Expressionslevel in humanen peripheren Blutzellen und eine vergleichbar hohe IFN γ -Produktion bei Co-Inkubation mit K562 (exprimiert Siglec7-Liganden). Die übrigen beiden CARs S7(D1) und S7(D1+2) zeigten im Vergleich eine deutlich geringere Expression und IFN γ -Ausschüttung. In weiteren Experimenten konnten die Autoren zeigen, dass der S7-CAR spezifisch gegen verschiedene Tumorzelllinien (Leukämie und solide Tumorzellen) zytotoxisch aktiv ist. Die CARs von Meril et al. sind ebenfalls CARs der zweiten Generation (mit CD28 und CD3 ζ). Damit ähnelt der S7(D1) CAR (nur die V-set Domäne) dem in dieser Arbeit getesteten Siglec7 LEC-CAR. Die Ergebnisse von Meril et al. zeigen, dass Siglec7-basierte CARs spezifisch antitumoral wirken können. Dafür ist allerdings die alleinige Verwendung der CRD von Siglec7 im CAR-Konstrukt nicht ausreichend und die zusätzliche Verwendung

zumindest der zweiten C2-set Immunglobulin-Domäne für eine optimale CAR-Funktion wichtig (Meril et al. 2020).

Insgesamt spielt der Spacer als Abstandshalter zwischen der Antigen-bindenden Domäne und der Transmembrandomäne durch Einfluss auf die Flexibilität und die Länge des gesamten CAR-Konstrukts eine entscheidende Rolle auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen. Dabei ist die optimale Länge des Spacers auch von der Dichte und Lokalisation des jeweiligen Liganden auf der Plasmamembran der Zielzelle abhängig. Häufig verwendete Spacer stellen Domänen von IgG1, IgG4, CD8 α und CD28 dar (Jayaraman et al. 2020, Stornaiuolo et al. 2021, Taheri et al. 2024). In dieser Arbeit wurde im Siglec7 LEC-CAR humanes IgG1 und in der Version mit Linker ein zusätzlicher dreifacher Glycin-Serin-Linker als Spacer verwendet. Meril et al. haben in ihrem S7-CAR die gesamte extrazelluläre Domäne von Siglec7 verwendet, welche ohne weiteren Spacer direkt an die Transmembrandomäne von CD28 anschließt (Meril et al. 2020). Für einen noch größeren Abstand zwischen der CRD und der Plasmamembran könnte der Siglec7 LEC-CAR neben der Verwendung der beiden C2-set Immunglobulin-Domänen zusätzlich von weiteren Spacer-Anteilen wie der IgG1-Domäne für eine optimierte Ligandenbindung profitieren. Für einen noch längeren Spacer könnte zusätzlich die Ergänzung eines Linkers von Vorteil sein: entweder ein vier- oder fünffacher Glycin-Serin-Linker für eine erhöhte Flexibilität in der Ligandenbindung oder ein mehrfacher starrer EAAAK-Linker zur weiteren Erhöhung des Abstands – oder eine Kombination beider Linker-Motive (Li et al. 2016). Auch in den Fusions-LEC-CARs mit Siglec7 könnte ein optimierter Spacer dazu führen, dass eine Ligandenbindung und damit zytotoxische Aktivität möglich wird.

4.5 Der SRCL LEC-CAR ist gegenüber Leukämiezellen und der Brustkrebszelllinie KPL-1 zytotoxisch aktiv

Im Gegensatz zu den Fusions-LEC-CARs mit der SRCL-Domäne zeigte der einzelne SRCL LEC-CAR (ohne Linker) in NK92-Zellen eine spezifisch erhöhte Zytotoxizität im Vergleich mit dem Wildtyp gegenüber Lewis-X positiven Leukämiezellen – und dies schon bei einer niedrigen Effektor-Zielzell-Ratio von 1:1. In Zytotoxizitäts-Versuchen mit Ratios von unter 1:1 (0,1:1 und 0,5:1) zeigte sich zwar ebenfalls eine signifikant erhöhte Lyse der Lewis X-positiven Zelllinien durch die SRCL LEC-CAR exprimierenden NK92-Zellen – allerdings auch eine signifikant erhöhte Lyse der Lewis X-negativen Kontrollzelllinie OCI-M1. In niedrigeren Ratios scheint der SRCL LEC-CAR also unspezifischer zu töten.

Es kam zusätzlich zur nachgewiesenen Lyse der Zielzellen zu einer spezifisch erhöhten Degranulation und IFN γ -Freisetzung der SRCL LEC-CAR tragenden Effektorzellen nach Inkubation mit den Lewis X-positiven Zelllinien Molm13 und HL-60 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Bestimmung der IFN γ -Ausschüttung ist wichtig, weil dieses Zytokin *in vivo* an

der Aktivierung weiterer Immunzellen und damit an der Ausbildung einer breiten antitumoralen Wirkung beteiligt ist (Alspach et al. 2019).

Da der einzelne SRCL LEC-CAR allerdings nicht von den Vorteilen eines Fusions-CAR profitiert, spielt die *on-target/off-tumor* Toxizität hier potentiell eine größere Rolle. Es konnte zwar eine starke Bindung von SRCL an Granulozyten aus dem peripheren Blut, aber keine relevante Bindung an die CD34⁺ und CD38⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark gesunder Spender in dieser Arbeit nachgewiesen werden, sodass eine Immuntherapie mit dem SRCL LEC-CAR mit einer vergleichsweise geringen Hämatotoxizität einhergehen könnte. Lewis X wird allerdings auch auf solidem Gewebe exprimiert, unter anderem auf Brust-, Kolon- und Mundhöhlengewebe (Croce et al. 2007). Um einen erweiterten und umfassenden Überblick zur Expression von Lewis X auf gesundem Gewebe zu gewinnen, sollten Tissue-Microarrays von Normalgewebe mit SRCL analysiert werden. Die Nebenwirkungen der CAR-Immuntherapie auf gesundes Gewebe durch überlappende Antigenexpression können mit *in vitro* Versuchen dennoch nicht ausreichend abgeschätzt werden. Daher sollten *in vivo* Experimente im Tiermodell nicht nur zur Untersuchung der Effektivität des SRCL LEC-CARs, sondern auch zur Untersuchung der Toxizität durchgeführt werden. Falls durch die überlappende Antigenexpression mit gesundem Gewebe entsprechende Nebenwirkungen im Tiermodell auftreten, können im weiteren Verlauf Sicherungssysteme des SRCL LEC-CARs sinnvoll und nötig sein. Neben der oben beschriebenen kombinierten Verwendung der SRCL-Domäne in verschiedenen Fusions-CARs wäre beispielsweise auch eine Steuerungsmöglichkeit über ein *off-switch* mit einem eingebauten Suizidgen zur Erhöhung der Sicherheit des einzelnen CARs denkbar (Elahi et al. 2018). In diesem Fall enthalten die transduzierten Zellen beispielsweise zusätzlich eine induzierbare Caspase 9. Diese wird nach intravenöser Gabe der Substanz AP1903 aktiv und führt rasch zur Apoptose der CAR-Effektorzellen (Gargett und Brown 2014). Alternativ ist auch eine Steuerung mit einem *on-switch* über die intravenöse Gabe einer exogenen Substanz, welche die CAR-T-Zellen spezifisch aktiviert, möglich (Elahi et al. 2018). Bei dieser Methode dient ein rekombinant mit einem Neoantigen verbundener, tumorspezifischer Antikörper als aktivierender Mediator zwischen CAR-T-Zelle (mit Spezifität für das Neoantigen) und Tumorzelle unter Bildung einer immunologischen Synapse (Rodgers et al. 2016).

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein C-Typ-Lektin-basierter CAR mit der CRD von SRCL gegenüber Leukämiezellen *in vitro* vollständig funktionsfähig und zytotoxisch aktiv ist. So kann Lewis X zusätzlich zu Lewis Y (Acharya und Walter 2020) in das mögliche Spektrum der TACAs zur Behandlung einer CAR-Immuntherapie bei Leukämien aufgenommen werden.

Da der SRCL LEC-CAR gegenüber Leukämiezellen eine spezifische Zytotoxizität zeigte, wurde zum Schluss überprüft, ob er auch gegenüber einer soliden Tumorentität eine antitumorale Wirkung zeigen würde. Dafür wurde die Lewis X-positive Brustkrebszelllinie KPL-1 herangezogen. Auch hier bewirkte der SRCL LEC-CAR ohne Linker eine erhöhte Zelllyse mit begleitender Degranulation und IFN γ -Freisetzung. Interessanterweise führte der gegenüber Leukämiezellen inaktive SRCL LEC-CAR mit Linker zu einer erhöhten Zytotoxizität der KPL-1 Zellen, jedoch auf einem niedrigeren Niveau als der CAR ohne Linker und ohne vermehrte Degranulation oder IFN γ -Sekretion. Damit scheint der zusätzlich eingebaute Linker im SRCL LEC-CAR auch bei dieser soliden Tumorentität insgesamt nicht von Vorteil zu sein – gegensätzlich zu dem CD301-CAR mit Linker von Franke et al., der im direkten Vergleich mit dem CAR ohne Linker eine höhere Zytotoxizität mit begleitender Degranulation und IFN γ -Produktion gegenüber verschiedenen Brustkrebszelllinien zeigte (Franke et al. 2023).

Die in dieser Arbeit gezeigten präliminären Ergebnisse der zytotoxischen Aktivität des SRCL LEC-CAR gegenüber KPL-1 sollten in weiteren Untersuchungen umfassender und mit einer Lewis X-negativen Brustkrebszelllinie als Kontrolle überprüft und gegebenenfalls auch auf andere solide Tumorentitäten ausgeweitet werden. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass der SRCL LEC-CAR nicht auf die Anwendung bei Leukämien beschränkt ist, sondern auch gegen solide Tumorzellen wirksam sein kann. Insgesamt konnte mit dem SRCL LEC-CAR bereits der zweite funktionstüchtige CAR auf Basis eines C-Typ Lektins zur spezifischen Erkennung von TACAs in unserer Arbeitsgruppe generiert werden.

4.6 Vorteile von LEC-CARs gegenüber konventionellen CARs

Die Verwendung von Lektindomänen anstelle von Antikörperfragmenten in CARs zur spezifischen Bindung von TACAs eröffnet neue Möglichkeiten in der CAR-T-Zellbasierten Tumorthherapie und geht mit einer Vielzahl von Vorteilen einher. So entfällt durch die Verwendung humaner Lektine (Meril et al. 2020, Franke et al. 2023) die immunogene Wirkung der oft genutzten murinen Antikörper in konventionellen CARs, die durch die Anti-CAR-Immunität zu vermindertem oder fehlendem Therapieansprechen führen kann (Wagner et al. 2021). Auch in dieser Arbeit wurden die CRDs der humanen Lektine SRCL und Siglec7 verwendet. Damit wirken die LEC-CARs im Vergleich zu Antikörper-basierten CARs weniger immunogen.

Viele TACAs wirken im Vergleich mit Proteinantigenen nur schwach immunogen, was die Entwicklung von hochaffinen glykanspezifischen Antikörpern für den Einsatz in CARs erschwert. Lektine hingegen fungieren als natürliche und spezifische Bindungspartner für Kohlenhydratantigene und bieten so eine gute Alternative zum Einsatz von monoklonalen Antikörpern in CAR-Konstrukten (Meléndez et al. 2022, McKenna et al. 2023).

Meléndez et al. haben die zytotoxische Aktivität ihrer Lektin-basierten CARs gegen Gb3 im Vergleich mit einem CD19-CAR als Positivkontrolle an Burkitt-Lymphom-Zelllinien (Gb3- und CD19-positiv) untersucht. Bei vergleichbar hohen Zytotoxizitätsraten produzierten die Lektin-basierten Shiga-CAR-T-Zellen deutlich weniger vom Zytokin Tumornekrosefaktor α als die CD19-CAR-T-Zellen (Meléndez et al. 2022). Die reduzierte Zytokinausschüttung könnte an der schwächeren Affinität zwischen Lektin und Glykanstruktur im Vergleich mit der Antikörper-Antigen-Bindung liegen (Cummings et al. 2015) und zu einem geringeren Risiko für ein schweres CRS beim Einsatz von CAR-T-Zellen führen (Meléndez et al. 2022). Vorteilhaft bei der Verwendung von Lektin-basierten CARs ist weiterhin, dass Lektine natürlich im menschlichen Organismus vorhanden sind und im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern nicht erst zeitintensiv entwickelt werden müssen. Dadurch wird die CAR-Produktion auf Lektin-Basis deutlich beschleunigt (Franke et al. 2023).

Antikörper-basierte CARs gegen TACAs binden entweder nur sehr spezifisch an einzelne Glykanstrukturen oder nur an bestimmte Glykoproteine. Im letzteren Fall können Veränderungen an dem Proteinrückgrat durch Mutationen zu einem Tumorescape und damit zum Wirkverlust von CAR-T-Zellen führen. Lektine hingegen zeigen Bindungsspezifitäten für mehrere, häufig ähnliche Glykanstrukturen und binden dabei unabhängig vom Trägerprotein. Lektin-basierte CARs könnten daher mit einem geringeren Risiko für ein Tumorescape im Laufe einer CAR-Immuntherapie einhergehen (Steentoft et al. 2018, Franke et al. 2023).

Konventionelle Antikörper-basierte CAR-Immuntherapien sind aufgrund der für die Tumorentität spezifische Antigenexpression meist auf eine maligne Erkrankungen limitiert. So sind CD19-CAR-T-Zellen beispielsweise auf die Anwendung bei malignen Neoplasien der B-Zellen beschränkt, die CD19 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Ahmad et al. 2020). Gegensätzlich dazu werden teilweise dieselben TACAs auf gänzlich verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert. So war in dieser Arbeit der SRCL LEC-CAR sowohl gegen die Lewis X-positiven Leukämiezelllinien Molm13 und HL-60 als auch gegen die Lewis X-positive Brustkrebszelllinie KPL-1 zytotoxisch aktiv. Der CD301-CAR von Franke et al. zeigte ebenfalls eine spezifische Zytotoxizität sowohl gegen Tn/STn-positive Brustkrebszelllinien als auch gegen Tn/STn-positive Osteosarkomzelllinien (Franke et al. 2023, Prasse et al. 2024). Auch der Siglec7- und der Siglec9-CAR von Meril et al. zeigten eine antitumorale Wirkung gegen Zelllinien von verschiedenen Tumorarten (solide Tumore und Leukämien) (Meril et al. 2020). Darüber hinaus konnten McKenna et al. einen dualen Wirkmechanismus ihres Lektin-basierten CARs aufzeigen, der an das gleiche TACA (Mannose-reiche Oligosaccharide) auf sowohl Pankreastumorzellen als auch dem tumorassoziierten Stroma binden kann, da beide von derselben aberranten Glykosylierung betroffen sind. Dadurch könnte die Wirkung von CAR-Immuntherapien bei soliden Tumoren

deutlich verbessert werden (McKenna et al. 2023). Insgesamt ergibt sich so eine breiter gefächerte Anwendbarkeit von Lektin-basierten gegenüber konventionellen Antikörper-basierten CAR-T-Zellen.

Allerdings würde sich ein erhöhter Aufwand der Lektin-basierten CAR-T-Zelltherapie zur potentiellen Behandlung von Leukämien aus der Tatsache ergeben, dass die Oberflächenglykosylierung auf Leukämieproben bisher nicht routinemäßig analysiert wird. Im Gegensatz dazu wird bei jedem Patienten mit Leukämie standardmäßig im Rahmen der initialen Diagnostik die Expression von CD19 durchflusszytometrisch untersucht (Escherich und Schrappe 2021), woraus sich direkt die Möglichkeit einer Antikörper-basierten CD19-CAR-T-Zelltherapie ableiten lässt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, weist die Oberflächenglykosylierung bei Leukämieproben eine hohe interindividuelle Varianz auf. Damit müsste bei jedem Patienten einzeln geprüft werden, welcher LEC-CAR für eine Therapie infrage kommen würde. Das geht mit einem erhöhten Zeit- und Kostenfaktor einher.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten verschiedene TACAs für eine potentielle CAR-Immuntherapie auf frischen primären Leukämieproben nachgewiesen werden. Relevant waren dabei vor allem die Liganden von SRCL, Siglec4a, Siglec7, Siglec9 und Siglec10. Die Stichprobe war allerdings insgesamt klein und heterogen, sodass hier weitere und größere Analysen der Oberflächenglykosylierung in den verschiedenen Untergruppen nötig sind. Dabei sollten nur frische primäre Proben verwendet werden und möglichst im Vergleich auch die Oberflächenglykosylierung von gesunden Zellen des hämatopoetischen Systems mitbestimmt und berücksichtigt werden.

Fusions-CARs bieten potentiell einige Vorteile gegenüber Einzel-CARs. Die in dieser Arbeit generierten Fusions-LEC-CARs zeigten allerdings keine funktionelle Aktivität. Da auch der einzelne Siglec7 LEC-CAR seine Liganden nicht binden konnte und zytotoxisch nicht aktiv war, steht die Optimierung der Bindungsfähigkeit der Siglec7-Domäne durch Addition der beiden extrazellulären C2-set Immunglobulin-Domänen zusätzlich zur CRD, gegebenenfalls kombiniert mit einem Spacer (beispielsweise IgG1-Domäne, Glycin-Serin- oder EAAAK-Linker) zur Erhöhung des Abstands zwischen CRD und Plasmamembran, sowohl im Einzel- als auch im Fusions-LEC-CAR im Vordergrund. Auch der Einfluss des Linkers zwischen den CRDs von Siglec7 und SRCL im Tandem-CAR sollte in Bezug auf Funktionalität und Ligandenbindung näher untersucht werden. Neben der Verwendung in einem Tandem-CAR könnten die Domänen von SRCL und eines optimierten Siglec7 beispielsweise auch in einem konditionalen CAR aufgeteilt werden. Ebenfalls könnte die

SRCL-Domäne statt mit Siglec7 auch mit einer Antikörper-Domäne (scFv mit Spezifität für ein TACA oder ein Proteinantigen) in einem Fusions-CAR kombiniert werden.

Der einzelne SRCL LEC-CAR hingegen konnte seinen Liganden Lewis X spezifisch binden und war gegenüber Lewis X-positiven Leukämiezelllinien zytotoxisch aktiv. Damit wurde in dieser Arbeit der erste funktionsfähige C-Typ Lektin-basierte CAR, der sich gegen TACAs auf Leukämiezellen richtet, untersucht.

Der SRCL-LEC-CAR sollte zur weiteren Überprüfung auch in primären T-Zellen getestet werden. In dieser Arbeit wurde die NK92-Zelllinie als Effektorzellen für eine vergleichbare Funktion in verschiedenen Versuchsreihen gewählt, da bei primären T-Zellen stets eine Variabilität durch Spenderabhängigkeit besteht. In diesem Zusammenhang sollte auch die Expression von Lewis X spezifisch auf primären T-Zellen untersucht werden, um einen möglichen Fraternizid auszuschließen. Die zytotoxische Aktivität von mit dem SRCL LEC-CAR transduzierten primären T-Zellen sollte dann in weiteren Experimenten gegenüber primären Leukämieproben untersucht werden. Vorläufige Experimente haben allerdings gezeigt, dass der Calcein-basierte Zytotoxizitäts-Versuch für primäre Proben nicht geeignet ist, da das Calcein-AM von den primären Zellen deutlich weniger als von den Leukämiezelllinien aufgenommen und verstoffwechselt wird. Hier würde sich beispielsweise ein FACS-basierter Zytotoxizitätsversuch besser eignen.

Der SRCL LEC-CAR zeigte auch eine spezifische Zytotoxizität gegenüber der Lewis X-positiven Brustkrebszelllinie KPL-1. Zur Erweiterung des Tumorentitätenspektrums des SRCL LEC-CARs sind hier umfassendere Analysen nötig – auch gegen andere solide Tumorzelllinien.

Da die Toxizität durch überlappende Antigenexpression zwischen malignen und normalen Zellen und systemische Nebenwirkungen von CAR-T-Zelltherapien im Organismus relevant sind und limitierend für den Therapieerfolg sein können, ist es im weiteren Verlauf wichtig, die *in vitro* generierten Ergebnisse des SRCL LEC-CARs auch in Tiermodellen zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

In der Therapie von Kindern mit refraktärer oder rezidivierter Leukämie stellen spezifische Immuntherapien wie eine Chimäre Antigen-Rezeptor (CAR)-T-Zelltherapie eine neuartige Behandlungsoption dar. Neben Proteinantigenen bieten sich dabei auch tumorspezifische Glykanstrukturen als neue Angriffspunkte an. Während die Bindungsspezifität von konventionellen CARs durch ein Antikörperfragment bedingt ist, wird in dieser Arbeit die kohlenhydraterkennende Domäne (CRD) von Lektinen in sogenannten LEC-CARs zur Erkennung von tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen auf der Oberfläche von Leukämiezellen verwendet. Um neue Erkenntnisse über potentielle Glykane als Zielstrukturen für eine CAR-geleitete Immuntherapie zu gewinnen, wurde zunächst die Oberflächenglykosylierung von neun primären Leukämieproben mittels zehn verschiedenen rekombinanten humanen Lektinen (CD301, SRCL, DC-SIGN, Siglec2, Siglec3, Siglec4a, Siglec5, Siglec7, Siglec9, Siglec10) durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde besonders die Bindung von SRCL auf adulten AML-Proben und von Siglec4a, Siglec7, Siglec9 und Siglec10 auf adulten und pädiatrischen Leukämieproben nachgewiesen. Dies deutet auf die Expression von Lewis X und eine Hypersialylierung von Oberflächenproteinen von Leukämiezellen hin. Um mögliche *on target/off tumor*-Effekte zu berücksichtigen, wurden zum Vergleich auch Zellen des hämatopoetischen Systems (peripheres Blut und Knochenmark) gesunder Spender bezüglich der Oberflächenglykosylierung analog untersucht. In der Gesamtschau dieser Glykosylierungsmuster von Leukämiezellen und gesunden Zellen wurden SRCL und Siglec7 als die vielversprechendsten Lektindomänen für die Generierung von LEC-CARs ausgewählt. Die CRDs von SRCL und Siglec7 wurden dafür an ein konventionelles CAR-Rückgrat der zweiten Generation (mit CD28 und CD3 ζ) fusioniert. In dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob die Kombination von zwei CRDs in einem Fusions-LEC-CAR die Spezifität und zytotoxische Effektivität im Vergleich mit LEC-CARs mit monomerer CRD steigern kann. Dafür wurden neben den einzelnen LEC-CARs auch die CRDs von SRCL und Siglec7 in einem Tandem-CAR-Konstrukt fusioniert. Nach viraler Transduktion von NK92-Zellen mit den LEC-CARs wurden diese hinsichtlich ihrer Oberflächenlokalisation und Bindungseigenschaften evaluiert und hinsichtlich ihrer Spezifität und Effektivität gegenüber Leukämiezelllinien in Bezug auf Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Produktion untersucht. Obwohl die Fusions-LEC-CARs und der Siglec7 LEC-CAR spezifisch auf der NK92-Zelloberfläche nachgewiesen werden konnten, zeigte sich keinerlei funktionelle Aktivität gegenüber verschiedenen Leukämiezelllinien. Der SRCL LEC-CAR hingegen konnte seinen Liganden Lewis X spezifisch binden, lysierte die Lewis X-positiven Leukämiezelllinien Molm13 und HL-60 und die Lewis X-positive Brustkrebszelllinie KPL-1,

jeweils mit begleitender Degranulation und IFN γ -Freisetzung. Diese Arbeit zeigt mit dem SRCL LEC-CAR eine neue Option für die Therapie von Lewis X-positiven Leukämien auf – mit potentieller Ausweitung auch auf solide Tumorentitäten.

5.2 Englisch

Specific immunotherapy such as chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy is a new treatment option for children with relapsed and refractory leukemia. Besides protein-epitopes tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs) also offer a possibility for CAR-T cells to attack cancer cells. Whilst the antigen specificity of conventional CARs results from an antibody fragment, in this work the carbohydrate recognition domain (CRD) of lectins is used in so-called LEC-CARs to specifically bind TACAs on leukemia cells. To gain new insights into TACAs that could serve as a target for CAR-T cell therapy, the surface glycosylation profile of nine primary leukemia samples was studied by flow cytometry using ten recombinant human lectins (CD301, SRCL, DC-SIGN, Siglec2, Siglec3, Siglec4a, Siglec5, Siglec7, Siglec9, Siglec10). The analysis showed that SRCL was able to bind to adult AML samples and Siglec4a, Siglec7, Siglec9 and Siglec10 to adult and pediatric leukemia samples. This indicates the expression of Lewis X and hypersialylation on the surface of leukemia cells. Overlapping glycan expression between normal and leukemia cells can cause relevant adverse reactions and therefore the surface glycosylation profile of normal hematopoietic cells (peripheral blood mononuclear cells and hematopoietic stem cells) was analogously analyzed. Keeping the results of overlapping glycan expression in mind, SRCL and Siglec7 were chosen as the most promising lectin domains for generating LEC-CARs. The CRDs of SRCL and Siglec7 were fused to a conventional second-generation CAR-backbone (with CD28 und CD3 ζ). In this work the hypothesis was tested that the specificity and cytotoxic efficacy may be increased by combining two CRDs in comparison with only using one CRD in a LEC-CAR. Therefore, combinatorial LEC-CARs (tandem CARs) using the CRD of SRCL and Siglec7 were generated in addition to the LEC-CARs using the monomeric CRD. After viral transduction of NK92 cells with the LEC-CARs, analysis of the surface localization and binding properties of these receptors were performed. LEC-CAR expressing NK92 cells were also tested for their specificity and efficacy against leukemia cells regarding cytotoxicity, degranulation and production of IFN γ . Despite the proven localization of combinatorial LEC-CARs and Siglec7 LEC-CAR on the surface of NK92 cells cytotoxic activity of the expressing effector cells against leukemia cells could not be shown. Contrarily, SRCL LEC-CAR expressing NK92 cells were able to specifically bind Lewis X, to kill the Lewis X-expressing leukemia cell lines Molm13 und HL-60 and the Lewis X-expressing breast cancer cell line KPL-1, accompanied by significantly

increased degranulation and production of IFN γ . This work shows that SRCL LEC-CAR is a new option for therapy of Lewis X-expressing leukemia and also potentially of solid tumors.

6 Literaturverzeichnis

- ABKEN, H. 2021. Building on Synthetic Immunology and T Cell Engineering: A Brief Journey Through the History of Chimeric Antigen Receptors. *Hum Gene Ther*, 32(19-20), 1011-1028.
- ACHARYA, U. H. & WALTER, R. B. 2020. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Modified Immune Effector Cell Therapy for Acute Myeloid Leukemia (AML). *Cancers (Basel)*, 12(12), 3617.
- AHMAD, A., UDDIN, S. & STEINHOFF, M. 2020. CAR-T Cell Therapies: An Overview of Clinical Studies Supporting Their Approved Use against Acute Lymphoblastic Leukemia and Large B-Cell Lymphomas. *Int J Mol Sci*, 21(11), 3906.
- ALSPACH, E., LUSSIER, D. M. & SCHREIBER, R. D. 2019. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11(3), a028480.
- AMEZ MARTÍN, M., WUHRER, M. & FALCK, D. 2021. Serum and Plasma Immunoglobulin G Fc N-Glycosylation Is Stable during Storage. *J Proteome Res*, 20(5), 2935-2941.
- ANGATA, T., HAYAKAWA, T., YAMANAKA, M., VARKI, A. & NAKAMURA, M. 2006. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *Faseb j*, 20(12), 1964-73.
- BARBIER, V., ERBANI, J., FIVEASH, C., DAVIES, J. M., TAY, J., TALLACK, M. R., LOWE, J., MAGNANI, J. L., PATTABIRAMAN, D. R., PERKINS, A. C., LISLE, J., RASKO, J. E. J., LEVESQUE, J. P. & WINKLER, I. G. 2020. Endothelial E-selectin inhibition improves acute myeloid leukaemia therapy by disrupting vascular niche-mediated chemoresistance. *Nat Commun*, 11(1), 2042.
- BLIXT, O., COLLINS, B. E., VAN DEN NIEUWENHOF, I. M., CROCKER, P. R. & PAULSON, J. C. 2003. Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem*, 278(33), 31007-19.
- BLÖCHL, C., WANG, D., MADUNIĆ, K., LAGEVEEN-KAMMEIJER, G. S. M., HUBER, C. G., WUHRER, M. & ZHANG, T. 2021. Integrated N- and O-Glycomics of Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines. *Cells*, 10(11), 3058.
- BLÖCHL, C., WANG, D., MAYBORODA, O. A., LAGEVEEN-KAMMEIJER, G. S. M. & WUHRER, M. 2023. Transcriptionally imprinted glycomic signatures of acute myeloid leukemia. *Cell Biosci*, 13(1), 31.
- BRENNER, M. K. 2013. CAR T cells for acute myeloid leukemia: the LeY of the land. *Mol Ther*, 21(11), 1983-4.
- BROWN, G. D., WILLMENT, J. A. & WHITEHEAD, L. 2018. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 18(6), 374-389.
- BRUDNO, J. N. & KOCHENDERFER, J. N. 2019. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*, 3445-55.
- CHEN, N., LI, X., CHINTALA, N. K., TANO, Z. E. & ADUSUMILLI, P. S. 2018. Driving CARs on the uneven road of antigen heterogeneity in solid tumors. *Curr Opin Immunol*, 51, 103-110.
- CHOI, T. & KANG, Y. 2022. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for multiple myeloma. *Pharmacol Ther*, 232, 108007.
- COOMBS, P. J., GRAHAM, S. A., DRICKAMER, K. & TAYLOR, M. E. 2005. Selective binding of the scavenger receptor C-type lectin to Lewisx trisaccharide and related glycan ligands. *J Biol Chem*, 280(24), 22993-9.

- CREUTZIG, U., DWORZAK, M. & REINHARDT, D. 2019. *S1-Leitlinie Akute myeloische Leukämie - AML - im Kindes- und Jugendalter* [Online]. https://register.awmf.org/assets/guidelines/025-031I_S1_Akute-myeloische-Leukaemie-AML-Kinder-Jugendliche_2019-09-abgelaufen.pdf AWMF online - Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). [Accessed 19.09.2024, 17:55].
- CROCE, M. V., ISLA-LARRAIN, M., RABASSA, M. E., DEMICHELIS, S., COLUSSI, A. G., CRESPO, M., LACUNZA, E. & SEGAL-EIRAS, A. 2007. Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. *Pathol Oncol Res*, 13(2), 130-8.
- CROCKER, P. R., PAULSON, J. C. & VARKI, A. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 7(4), 255-66.
- CUMMINGS, R. D., SCHNAAR, R. L., ESKO, J. D., DRICKAMER, K. & TAYLOR, M. E. 2015. Principles of Glycan Recognition. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., STANLEY, P., HART, G. W., AEBI, M., DARVILL, A. G., KINOSHITA, T., PACKER, N. H., PRESTEGARD, J. H., SCHNAAR, R. L. & SEEBERGER, P. H. (eds.) *Essentials of Glycobiology*. 3. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 373-385.
- DAI, H., WU, Z., JIA, H., TONG, C., GUO, Y., TI, D., HAN, X., LIU, Y., ZHANG, W., WANG, C., ZHANG, Y., CHEN, M., YANG, Q., WANG, Y. & HAN, W. 2020. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 13(1), 30.
- DAVER, N. 2020. A bispecific approach to improving CAR T cells in AML. *Blood*, 135(10), 703-704.
- DRICKAMER, K. & TAYLOR, M. E. 2015. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr Opin Struct Biol*, 34, 26-34.
- ELAHI, R., KHOSH, E., TAHMASEBI, S. & ESMAEILZADEH, A. 2018. Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Front Immunol*, 9, 1717.
- ELOLA, M. T., CAPURRO, M. I., BARRIO, M. M., COOMBS, P. J., TAYLOR, M. E., DRICKAMER, K. & MORDOH, J. 2007. Lewis x antigen mediates adhesion of human breast carcinoma cells to activated endothelium. Possible involvement of the endothelial scavenger receptor C-type lectin. *Breast Cancer Res Treat*, 101(2), 161-74.
- ERDMANN, F., KAATSCH, P., GRABOW, D. & SPIX, C. 2020. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., VOLLMER, G., WEG-REMER, S., BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., IMHOFF, M., KRAYWINKEL, K., STARKER, A., VON BERENBERG-GOSSLER, P. & WIENECKE, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- ESCHERICH, G. & SCHRAPPE, M. 2021. *S1-Leitlinie Akute lymphoblastische (ALL) Leukämie im Kindesalter* [Online]. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014I_S1_Akute-lymphoblastische-Leukaemie-ALL-im-Kindesalter_2021-07.pdf AWMF online -

- Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). [Accessed 3.10.2022 12:24].
- FEINBERG, H., TAYLOR, M. E. & WEIS, W. I. 2007. Scavenger receptor C-type lectin binds to the leukocyte cell surface glycan Lewis(x) by a novel mechanism. *J Biol Chem*, 282(23), 17250-8.
- FLUGEL, C. L., MAJZNER, R. G., KRENCIUTE, G., DOTTI, G., RIDDELL, S. R., WAGNER, D. L. & ABOU-EL-ENEIN, M. 2023. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, 20(1), 49-62.
- FRANKE, A. K., WESOLOWSKI, C., THADEN, V., MÜLLER, I. & CORNILS, K. 2023. Glyco-binding domain chimeric antigen receptors as a new option for cancer immunotherapy. *Gene Ther*, 30(7-8), 603-611.
- GARGETT, T. & BROWN, M. P. 2014. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol*, 5, 235.
- GAUDICHON, J., JAKOBCZYK, H., DEBAIZE, L., COUSIN, E., GALIBERT, M. D., TROADEC, M. B. & GANDEMERE, V. 2019. Mechanisms of extramedullary relapse in acute lymphoblastic leukemia: Reconciling biological concepts and clinical issues. *Blood Rev*, 3640-56.
- GIJZEN, K., RAYMAKERS, R. A., BROERS, K. M., FIGDOR, C. G. & TORENSMA, R. 2008. Interaction of acute lymphoblastic leukemia cells with C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN. *Exp Hematol*, 36(7), 860-70.
- GÖKBÜGET, N., DOMBRET, H., BONIFACIO, M., REICHLE, A., GRAUX, C., FAUL, C., DIEDRICH, H., TOPP, M. S., BRÜGGEMANN, M., HORST, H. A., HAVELANGE, V., STIEGLMAIER, J., WESSELS, H., HADDAD, V., BENJAMIN, J. E., ZUGMAIER, G., NAGORSEN, D. & BARGOU, R. C. 2018. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 131(14), 1522-1531.
- GRADA, Z., HEGDE, M., BYRD, T., SHAFFER, D. R., GHAZI, A., BRAWLEY, V. S., CORDER, A., SCHÖNFELD, K., KOCH, J., DOTTI, G., HESLOP, H. E., GOTTSCHALK, S., WELS, W. S., BAKER, M. L. & AHMED, N. 2013. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2(7), e105.
- GUO, Y., FEINBERG, H., CONROY, E., MITCHELL, D. A., ALVAREZ, R., BLIXT, O., TAYLOR, M. E., WEIS, W. I. & DRICKAMER, K. 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, 11(7), 591-8.
- HARTMANN, J., SCHÜSSLE-LENZ, M., BONDANZA, A. & BUCHHOLZ, C. J. 2017. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*, 9(9), 1183-1197.
- HATTORI, T. 2022. Galectins: Their Network and Roles in Infection/Immunity/Tumor Growth Control 2021. *Biomolecules*, 12(9), 1255.
- HE, X., FENG, Z., MA, J., LING, S., CAO, Y., GURUNG, B., WU, Y., KATONA, B. W., O'DWYER, K. P., SIEGEL, D. L., JUNE, C. H. & HUA, X. 2020. Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. *Blood*, 135(10), 713-723.
- HOFMANN, S., SCHUBERT, M. L., WANG, L., HE, B., NEUBER, B., DREGER, P., MÜLLER-TIDOW, C. & SCHMITT, M. 2019. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML). *J Clin Med*, 8(2), 200.

- HOJA-ŁUKOWICZ, D., PRZYBYŁO, M., DUDA, M., POCHEĆ, E. & BUBKA, M. 2017. On the trail of the glycan codes stored in cancer-related cell adhesion proteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861(1 Pt A), 3237-3257.
- HUANG, C. H., LIAO, Y. J., FAN, T. H., CHIOU, T. J., LIN, Y. H. & TWU, Y. C. 2018. A Developed NK-92MI Cell Line with Siglec-7(neg) Phenotype Exhibits High and Sustainable Cytotoxicity against Leukemia Cells. *Int J Mol Sci*, 19(4), 1073.
- HUDAK, J. E., CANHAM, S. M. & BERTOZZI, C. R. 2014. Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat Chem Biol*, 10(1), 69-75.
- JANDUS, C., BOLIGAN, K. F., CHIJOKE, O., LIU, H., DAHLHAUS, M., DÉMOULINS, T., SCHNEIDER, C., WEHRLI, M., HUNGER, R. E., BAERLOCHER, G. M., SIMON, H. U., ROMERO, P., MÜNZ, C. & VON GUNTEN, S. 2014. Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *J Clin Invest*, 124(4), 1810-20.
- JAYARAMAN, J., MELLODY, M. P., HOU, A. J., DESAI, R. P., FUNG, A. W., PHAM, A. H. T., CHEN, Y. Y. & ZHAO, W. 2020. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 58, 102931.
- JETANI, H., NAVARRO-BAILÓN, A., MAUCHER, M., FRENZ, S., VERBRUGGEN, C. M., YEGUAS, A., VIDRIALES, M. B., GONZÁLEZ, M., RIAL SABORIDO, J., KRAUS, S., MESTERMANN, K., THOMAS, S., BONIG, H., LUU, M., MONJEZI, R., MOUGIAKAKOS, D., SAUER, M., EINSELE, H. & HUDECEK, M. 2021. Siglec-6 is a novel target for CAR T-cell therapy in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 138(19), 1830-1842.
- JOHANNES, L., JACOB, R. & LEFFLER, H. 2018. Galectins at a glance. *J Cell Sci*, 131(9).
- JUNE, C. H. & SADELAIN, M. 2018. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med*, 379(1), 64-73.
- KANTARJIAN, H., STEIN, A., GÖKBÜGET, N., FIELDING, A. K., SCHUH, A. C., RIBERA, J. M., WEI, A., DOMBRET, H., FOÀ, R., BASSAN, R., ARSLAN, Ö., SANZ, M. A., BERGERON, J., DEMIRKAN, F., LECH-MARANDA, E., RAMBALDI, A., THOMAS, X., HORST, H. A., BRÜGGEMANN, M., KLAPPER, W., WOOD, B. L., FLEISHMAN, A., NAGORSEN, D., HOLLAND, C., ZIMMERMAN, Z. & TOPP, M. S. 2017. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 376(9), 836-847.
- KATTNER, P., STROBEL, H., KHOSHNEVIS, N., GRUNERT, M., BARTHOLOMAE, S., PRUSS, M., FITZEL, R., HALATSCH, M. E., SCHILBERG, K., SIEGELIN, M. D., PERAUD, A., KARPEL-MASSLER, G., WESTHOFF, M. A. & DEBATIN, K. M. 2019. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev*, 38(4), 673-682.
- KÖTTGEN, E., REUTTER, W. & TAUBER, R. 2003. [Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine]. *Med Klin (Munich)*, 98(12), 717-38.
- KRISHNAMOORTHY, L. & MAHAL, L. K. 2009. Glycomic analysis: an array of technologies. *ACS Chem Biol*, 4(9), 715-32.
- LAETSCH, T. W., MAUDE, S. L., RIVES, S., HIRAMATSU, H., BITTENCOURT, H., BADER, P., BARUCHEL, A., BOYER, M., DE MOERLOOSE, B., QAYED, M., BUECHNER, J., PULSIPHER, M. A., MYERS, G. D., STEFANSKI, H. E., MARTIN, P. L., NEMECEK, E., PETERS, C., YANIK, G., KHAW, S. L., DAVIS, K. L., KRUEGER, J., BALDUZZI, A., BOISSEL, N., TIWARI, R., O'DONOVAN, D. & GRUPP, S. A. 2023. Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young

- Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. *J Clin Oncol*, 41(9), 1664-1669.
- LENKEI, R., BJÖRK, O., OST, A. & BIBERFELD, P. 1991. Expression of CD15 as predictor of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia of the pre-B type. *Leuk Res*, 15(4), 189-94.
- LEONTI, A. R., PARDO, L., ALONZO, T. A., GERBING, R. B., EIDENSCHINK BRODERSEN, L., RIES, R. E., SMITH, J. L., LE, Q., APLENC, R., KOLB, E. A., MAGNANI, J. L., FOGLER, W. E., LOKEN, M. R. & MESHINCHI, S. 2019. Transcriptome Profiling of Glycosylation Genes Defines Correlation with E-Selectin Ligand Expression and Clinical Outcome in AML. *Blood*, 1343772-3772.
- LESCH, S. & GILL, S. 2021. The promise and perils of immunotherapy. *Blood Adv*, 5(18), 3709-3725.
- LI, G., HUANG, Z., ZHANG, C., DONG, B. J., GUO, R. H., YUE, H. W., YAN, L. T. & XING, X. H. 2016. Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(1), 215-25.
- LÖFFLER, A., GRUEN, M., WUCHTER, C., SCHRIEVER, F., KUFER, P., DREIER, T., HANAKAM, F., BAEUERLE, P. A., BOMMERT, K., KARAWAJEW, L., DÖRKEN, B. & BARGOU, R. C. 2003. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia*, 17(5), 900-9.
- MA, H., ZHOU, H., SONG, X., SHI, S., ZHANG, J. & JIA, L. 2015. Modification of sialylation is associated with multidrug resistance in human acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 34(6), 726-40.
- MA, R., YOU, F., TIAN, S., ZHANG, T., TIAN, X., XIANG, S., WU, H., YANG, N., AN, G. & YANG, L. 2024. Enhanced efficacy of CD19/CD22 bispecific CAR-T cells with EAAK linker on B-cell malignancies. *Eur J Haematol*, 112(1), 64-74.
- MACAULEY, M. S., CROCKER, P. R. & PAULSON, J. C. 2014. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 653-66.
- MAJZNER, R. G. & MACKALL, C. L. 2019. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med*, 25(9), 1341-1355.
- MANIER, S., INGENERE, T., ESCURE, G., PRODHOMME, C., NUDEL, M., MITRA, S. & FACON, T. 2022. Current state and next-generation CAR-T cells in multiple myeloma. *Blood Rev*, 54, 100929.
- MAROFI, F., MOTAVALLI, R., SAFONOV, V. A., THANGAVELU, L., YUMASHEV, A. V., ALEXANDER, M., SHOMALI, N., CHARTRAND, M. S., PATHAK, Y., JARAHIAN, M., IZADI, S., HASSANZADEH, A., SHIRAFKAN, N., TAHMASEBI, S. & KHIABI, F. M. 2021. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 81.
- MAUDE, S. L., LAETSCH, T. W., BUECHNER, J., RIVES, S., BOYER, M., BITTENCOURT, H., BADER, P., VERNERIS, M. R., STEFANSKI, H. E., MYERS, G. D., QAYED, M., DE MOERLOOSE, B., HIRAMATSU, H., SCHLIS, K., DAVIS, K. L., MARTIN, P. L., NEMECEK, E. R., YANIK, G. A., PETERS, C., BARUCHEL, A., BOISSEL, N., MECHINAUD, F., BALDUZZI, A., KRUEGER, J., JUNE, C. H., LEVINE, B. L., WOOD, P., TARAN, T., LEUNG, M., MUELLER, K. T., ZHANG, Y., SEN, K., LEBWOHL, D., PULSIPHER, M. A. & GRUPP, S. A. 2018. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 439-448.
- MAYNADIÉ, M., CAMPOS, L., MOSKOVITCHENKO, P., SABIDO, O., AHO, S., LENORMAND, B., CARLI, P. M., GUYOTAT, D., BÉNÉ, M. C., FAURE, G. & GEIL,

- T. 1997. Heterogenous expression of CD15 in acute lymphoblastic leukemia: a study of ten anti-CD15 monoclonal antibodies in 158 patients. *Leuk Lymphoma*, 25(1-2), 135-43.
- MCKENNA, M. K., OZCAN, A., BRENNER, D., WATANABE, N., LEGENDRE, M., THOMAS, D. G., ASHWOOD, C., CUMMINGS, R. D., BONIFANT, C., MARKOVITZ, D. M. & BRENNER, M. K. 2023. Novel banana lectin CAR-T cells to target pancreatic tumors and tumor-associated stroma. *J Immunother Cancer*, 11(1), e005891.
- MCKERRACHER, L., DAVID, S., JACKSON, D. L., KOTTIS, V., DUNN, R. J. & BRAUN, P. E. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 13(4), 805-11.
- MELÉNDEZ, A. V., VELASCO CÁRDENAS, R. M., LAGIES, S., STRIETZ, J., SIUKSTAITE, L., THOMAS, O. S., TOMISCH, J., WEBER, W., KAMMERER, B., RÖMER, W. & MINGUET, S. 2022. Novel lectin-based chimeric antigen receptors target Gb3-positive tumour cells. *Cell Mol Life Sci*, 79(10), 513.
- MERIL, S., HARUSH, O., REBOH, Y., MATIKHINA, T., BARLIYA, T. & COHEN, C. J. 2020. Targeting glycosylated antigens on cancer cells using siglec-7/9-based CAR T-cells. *Mol Carcinog*, 59(7), 713-723.
- MOHANTY, R., CHOWDHURY, C. R., AREGA, S., SEN, P., GANGULY, P. & GANGULY, N. 2019. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep*, 42(6), 2183-2195.
- MONDAL, S., CHANDRA, S. & MANDAL, C. 2010. Elevated mRNA level of hST6Gal I and hST3Gal V positively correlates with the high risk of pediatric acute leukemia. *Leuk Res*, 34(4), 463-70.
- MORSUT, L., ROYBAL, K. T., XIONG, X., GORDLEY, R. M., COYLE, S. M., THOMSON, M. & LIM, W. A. 2016. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 164(4), 780-91.
- MORTEZAI, N., BEHNKEN, H. N., KURZE, A. K., LUDEWIG, P., BUCK, F., MEYER, B. & WAGENER, C. 2013. Tumor-associated Neu5Ac-Tn and Neu5Gc-Tn antigens bind to C-type lectin CLEC10A (CD301, MGL). *Glycobiology*, 23(7), 844-52.
- NIKTOREH, N., LERIUS, B., ZIMMERMANN, M., GRUHN, B., ESCHERICH, G., BOURQUIN, J. P., DWORZAK, M., SRAMKOVA, L., ROSSIG, C., CREUTZIG, U., REINHARDT, D. & RASCHE, M. 2019. Gemtuzumab ozogamicin in children with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: a report by Berlin-Frankfurt-Münster study group. *Haematologica*, 104(1), 120-127.
- PAN, J., NIU, Q., DENG, B., LIU, S., WU, T., GAO, Z., LIU, Z., ZHANG, Y., QU, X., ZHANG, Y., LIU, S., LING, Z., LIN, Y., ZHAO, Y., SONG, Y., TAN, X., ZHANG, Y., LI, Z., YIN, Z., CHEN, B., YU, X., YAN, J., ZHENG, Q., ZHOU, X., GAO, J., CHANG, A. H., FENG, X. & TONG, C. 2019. CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 33(12), 2854-2866.
- PANG, X., LI, H., GUAN, F. & LI, X. 2018. Multiple Roles of Glycans in Hematological Malignancies. *Front Oncol*, 8, 364.
- PAVLIKOVA, L., SERES, M., IMRICHOVA, D., HANO, M., RUSNAK, A., ZAMOROVA, M., KATRLIK, J., BREIER, A. & SULOVA, Z. 2016. The expression of P-gp in leukemia cells is associated with cross-resistance to protein N-glycosylation inhibitor tunicamycin. *Gen Physiol Biophys*, 35(4), 497-510.
- POURMONTASERI, H., HABIBZADEH, N., ENTEZARI, S., SAMADIAN, F., KIYANI, S., TAHERI, M., AHMADI, A., FALLAHI, M. S., SHEIKHZADEH, F., ANSARI, A.,

- TAMIMI, A. & DERAVID, N. 2022. Monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphocytic leukemia: A literature review. *Hum Antibodies*, 30(3), 117-130.
- PRASSE, N., WESSOLOWSKI, C., MÜLLER, I., CORNILS, K. & FRANKE, A. K. 2024. Glycan Structures in Osteosarcoma as Targets for Lectin-Based Chimeric Antigen Receptor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 25(10), 5344.
- PUI, C. H. 2020. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Front Med*, 14(6), 689-700.
- RAPONI, S., DE PROPRIIS, M. S., INTOPPA, S., MILANI, M. L., VITALE, A., ELIA, L., PERBELLINI, O., PIZZOLO, G., FOÁ, R. & GUARINI, A. 2011. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma*, 52(6), 1098-107.
- RITCHIE, D. S., NEESON, P. J., KHOT, A., PEINERT, S., TAI, T., TANTON, K., CHEN, K., SHIN, M., WALL, D. M., HÖNEMANN, D., GAMBELL, P., WESTERMAN, D. A., HAURAT, J., WESTWOOD, J. A., SCOTT, A. M., KRAVETS, L., DICKINSON, M., TRAPANI, J. A., SMYTH, M. J., DARCY, P. K., KERSHAW, M. H. & PRINCE, H. M. 2013. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 21(11), 2122-9.
- RODGERS, D. T., MAZAGOVA, M., HAMPTON, E. N., CAO, Y., RAMADOSS, N. S., HARDY, I. R., SCHULMAN, A., DU, J., WANG, F., SINGER, O., MA, J., NUNEZ, V., SHEN, J., WOODS, A. K., WRIGHT, T. M., SCHULTZ, P. G., KIM, C. H. & YOUNG, T. S. 2016. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(4), E459-68.
- RODRIGUES MANTUANO, N., NATOLI, M., ZIPPELIUS, A. & LÄUBLI, H. 2020. Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 8(2), e001222.
- RODRÍGUEZ, E., SCHETTERS, S. T. T. & VAN KOOYK, Y. 2018. The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 18(3), 204-211.
- RÖLLIG, C., AYUK, F. A., BRAESS, J., HEUSER, M., MANZ, M. G., PASSWEG, J., REINHARDT, D., SCHLENK, R. F. & ZEBISCH, A. 2023. *Onkopedia Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML)* [Online]. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/> DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. [Accessed 09.05.2024 15:24].
- ROYBAL, K. T., RUPP, L. J., MORSUT, L., WALKER, W. J., MCNALLY, K. A., PARK, J. S. & LIM, W. A. 2016. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*, 164(4), 770-9.
- SAKAMOTO, J., FURUKAWA, K., CORDON-CARDO, C., YIN, B. W., RETTIG, W. J., OETTGEN, H. F., OLD, L. J. & LLOYD, K. O. 1986. Expression of Lewis^a, Lewis^b, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res*, 46(3), 1553-61.
- SCHAICH, M. 2020. Akute Leukämien. In: POSSINGER, K. R., A.C. EUCKER, J. (ed.) *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*. 5. ed. München: Elsevier, 376-400.
- SCHAUER, R. & KAMERLING, J. P. 2018. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 75, 1-213.
- SCHJOLDAGER, K. T., NARIMATSU, Y., JOSHI, H. J. & CLAUSEN, H. 2020. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(12), 729-749.

- SCHULTZ, M. J., SWINDALL, A. F. & BELLIS, S. L. 2012. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 501-18.
- SHAH, N. N., JOHNSON, B. D., SCHNEIDER, D., ZHU, F., SZABO, A., KEEVER-TAYLOR, C. A., KRUEGER, W., WORDEN, A. A., KADAN, M. J., YIM, S., CUNNINGHAM, A., HAMADANI, M., FENSKE, T. S., DROPULIĆ, B., ORENTAS, R. & HARI, P. 2020. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nat Med*, 26(10), 1569-1575.
- STEENTOFT, C., MIGLIORINI, D., KING, T. R., MANDEL, U., JUNE, C. H. & POSEY, A. D., JR. 2018. Glycan-directed CAR-T cells. *Glycobiology*, 28(9), 656-669.
- STORNAIUOLO, A., VALENTINIS, B., SIRINI, C., SCAVULLO, C., ASPERTI, C., ZHOU, D., MARTINEZ DE LA TORRE, Y., CORNA, S., CASUCCI, M., PORCELLINI, S. & TRAVERSARI, C. 2021. Characterization and Functional Analysis of CD44v6.CAR T Cells Endowed with a New Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor-Based Spacer. *Hum Gene Ther*, 32(13-14), 744-760.
- SU, H., WANG, M., PANG, X., GUAN, F., LI, X. & CHENG, Y. 2021. When Glycosylation Meets Blood Cells: A Glance of the Aberrant Glycosylation in Hematological Malignancies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 180, 85-117.
- SUBKLEWE, M. 2021. BiTEs better than CAR T cells. *Blood Adv*, 5(2), 607-612.
- TAHERI, F. H., HASSANI, M., SHARIFZADEH, Z., BEHDANI, M., ABDOLI, S., SAYADI, M., BAGHERZADEH, K., ARASHKIA, A. & ABOLHASSANI, M. 2024. Tuning spacer length improves the functionality of the nanobody-based VEGFR2 CAR T cell. *BMC Biotechnol*, 24(1), 1.
- THURIN, M. 2021. Tumor-Associated Glycans as Targets for Immunotherapy: The Wistar Institute Experience/Legacy. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 40(3), 89-100.
- TONG, C., ZHANG, Y., LIU, Y., JI, X., ZHANG, W., GUO, Y., HAN, X., TI, D., DAI, H., WANG, C., YANG, Q., LIU, W., WANG, Y., WU, Z. & HAN, W. 2020. Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood*, 136(14), 1632-1644.
- VAJARIA, B. N. & PATEL, P. S. 2017. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J*, 34(2), 147-156.
- VAN VLIET, S. J., VAN LIEMPT, E., SAELAND, E., AARNOUDSE, C. A., APPELMELK, B., IRIMURA, T., GEIJTENBEEK, T. B., BLIXT, O., ALVAREZ, R., VAN DIE, I. & VAN KOOYK, Y. 2005. Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int Immunol*, 17(5), 661-9.
- VARKI, A. 2017. Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3-49.
- VORMITTAG, P., GUNN, R., GHORASHIAN, S. & VERAITCH, F. S. 2018. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol*, 53164-181.
- WAGNER, D. L., FRITSCH, E., PULSIPHER, M. A., AHMED, N., HAMIEH, M., HEGDE, M., RUELLA, M., SAVOLDO, B., SHAH, N. N., TURTLE, C. J., WAYNE, A. S. & ABOU-EL-ENEIN, M. 2021. Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(6), 379-393.
- WANG, D., ZHANG, T., MADUNIĆ, K., DE WAARD, A. A., BLÖCHL, C., MAYBORODA, O. A., GRIFFIOEN, M., SPAAPEN, R. M., HUBER, C. G., LAGEVEEN-KAMMEIJER, G. S. M. & WUHRER, M. 2022. Glycosphingolipid-Glycan Signatures of Acute Myeloid Leukemia Cell Lines Reflect Hematopoietic Differentiation. *J Proteome Res*, 21(4), 1029-1040.

- YAMAKAWA, N., YASUDA, Y., YOSHIMURA, A., GOSHIMA, A., CROCKER, P. R., VERGOTEN, G., NISHIURA, Y., TAKAHASHI, T., HANASHIMA, S., MATSUMOTO, K., YAMAGUCHI, Y., TANAKA, H., KITAJIMA, K. & SATO, C. 2020. Discovery of a new sialic acid binding region that regulates Siglec-7. *Sci Rep*, 10(1), 8647.
- YIN, S. S. & GAO, F. H. 2020. Molecular Mechanism of Tumor Cell Immune Escape Mediated by CD24/Siglec-10. *Front Immunol*, 11, 1324.
- ZAH, E., LIN, M. Y., SILVA-BENEDICT, A., JENSEN, M. C. & CHEN, Y. Y. 2016. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*, 4(6), 498-508.
- ZAHARAN, A. M., ALY, S. S., RAYAN, A., EL-BADAWY, O., FATTAH, M. A., ALI, A. M., ELBADRE, H. M. & HETTA, H. F. 2018. Survival outcomes of CD34(+)CD38(-)LSCs and their expression of CD123 in adult AML patients. *Oncotarget*, 9(75), 34056-34065.
- ZHANG, Y. & ZHANG, Z. 2020. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*, 17(8), 807-821.
- ZHOU, H., MA, H., WEI, W., JI, D., SONG, X., SUN, J., ZHANG, J. & JIA, L. 2013. B4GALT family mediates the multidrug resistance of human leukemia cells by regulating the hedgehog pathway and the expression of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *Cell Death Dis*, 4(6), e654.
- ZWAAN, C. M., KOLB, E. A., REINHARDT, D., ABRAHAMSSON, J., ADACHI, S., APLENC, R., DE BONT, E. S., DE MOERLOOSE, B., DWORZAK, M., GIBSON, B. E., HASLE, H., LEVERGER, G., LOCATELLI, F., RAGU, C., RIBEIRO, R. C., RIZZARI, C., RUBNITZ, J. E., SMITH, O. P., SUNG, L., TOMIZAWA, D., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M., CREUTZIG, U. & KASPERS, G. J. 2015. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*, 33(27), 2949-62.
- ZWAAN, C. M., REINHARDT, D., ZIMMERMAN, M., HASLE, H., STARY, J., STARK, B., DWORZAK, M., CREUTZIG, U. & KASPERS, G. J. 2010. Salvage treatment for children with refractory first or second relapse of acute myeloid leukaemia with gemtuzumab ozogamicin: results of a phase II study. *Br J Haematol*, 148(5), 768-76.

7 Abkürzungsverzeichnis

(Sia)3	(Neu5Ac α)3-C3
6'SLN	<i>6'Sialyl-N-acetyllactosamine</i>
ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
B-ALL	B-Zellbasierte ALL
BCMA	<i>B-Cell-Maturation-Antigen</i>
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor
CAR-T-Zellen	Chimäre-Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLEC10A	<i>C-type lectin domain family 10 member A</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRS	<i>cytokine release syndrome</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced grün fluoreszierendes Protein</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FKS	Fötales Kälberserum
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FSC	Vorwärts-Streulicht
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Gb3	Globotriaosylceramid
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GS-Linker	Glycin-Serin-Linker
h.i.	hitzeinaktiviert
HER2	<i>Human epidermal growth factor</i>
HLA-Merkmalen	Humane Leukozyten-Antigen-Merkmale
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
hulgG1	humanes Immunglobulin G1
iCAR-T-Zellen	inhibitorische CAR-T-Zellen
IFN γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin-2
IHRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
LAMP-1	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein-1
LTR	<i>long terminal repeats</i>

mAb	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
min	Minuten
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid-Rückgrat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	2-Methoxy-1-methylacetat
r/r	rezidiert/refraktär
RPE	R-Phycoerythrin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
Siglec	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin</i>
SP	Signalpeptid
SRCL	<i>Scavenger Receptor C-Type Lectin</i>
SSC	Seitwärts-Streulicht
STn	Sialyl-Tn
SynNotch	synthetischer Notch
T-ALL	T-Zellbasierte ALL
u.a.	unter anderem
WT	Wildtyp
x g	relative Zentrifugalkraft

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchführung einer CAR-T-Zelltherapie	4
Abbildung 2: Ausgewählte tumorassoziierte Kohlenhydratantigene.....	9
Abbildung 3: Aufbau von LEC-CARs	17
Abbildung 4: Lage der zur Klonierung des Siglec7-SRCL LEC-CARs im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer und Schnittstellen	29
Abbildung 5: Generierung eines Fusions-LEC-CARs mit Linker	30
Abbildung 6: Lage der zur Sequenzierung verwendeten Primer im γ -retroviralen pBullet Vektor	35
Abbildung 7: Gating-Strategie von peripherem Blut zur Identifizierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten	42

Abbildung 7 ist mit Einwilligung der Urheberin adaptiert nach:

Prasse, N., Wessolowski, C., Müller, I., Cornils, K. & Franke, A. K. 2024.
Glycan Structures in Osteosarcoma as Targets for Lectin-Based
Chimeric Antigen Receptor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 25(10), 5344.
"Supplemental Figure S6: Staining results of normal human blood cells
from three different donors", Teil A.

Abbildung 8: Gating-Strategie von Knochenmark zur Identifizierung der CD34 ⁺ und CD38 ⁺ Stammzellen	42
Abbildung 9: Gating-Strategie von primären Leukämiezellen, frisch und aufgetaut nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen	43
Abbildung 10: Gating-Strategie zur Identifizierung der CD56 ⁺ und CD107a ⁺ NK92- Zellen im Degranulations-Test	46
Abbildung 11: Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf Leukämiezelllinien (von Dr. Anna-Katharina Franke durchgeführt und ausgewertet).....	49
Abbildung 12: Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf einer pädiatrischen cALL, frisch und aufgetaut nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen	50
Abbildung 13: Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf einer pädiatrischen T-ALL	51
Abbildung 14: Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders.....	53
Abbildung 15: Färbung spezifischer Glykanstrukturen auf der Oberfläche von CD34 ⁺ und CD38 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen	56
Abbildung 16: Schematischer Aufbau der (Fusions-)LEC-CARs	58
Abbildung 17: Bestimmung der GFP-Expression nach Transduktion und Sortierung der verschiedenen LEC-CAR tragenden NK92-Zellen	59
Abbildung 18: Oberflächennachweis der LEC-CARs mit den Antikörpern Anti-Myc und Anti-Siglec7.	61
Abbildung 19: Bindungseigenschaften der LEC-CARs an ihre Glykanliganden.....	62
Abbildung 20: Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs ohne Linker.....	64
Abbildung 21: Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs mit Linker	65
Abbildung 22: Zytotoxizität und MTT-Assay von SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker ...	67

Abbildung 23: Zytotoxizität und MTT-Assay von SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker in niedrigen Effektor-Zielzell-Ratios ≤ 1	68
Abbildung 24: Degranulation der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker	69
Abbildung 25: IFN γ -Freisetzung der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker	71
Abbildung 26: Färbung spezifischer Glykanstrukturen mit rekombinanten Lektinen auf der Zelllinie KPL-1 sowie Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ - Freisetzung des SRCL-LEC-CARs mit und ohne Linker gegenüber KPL-1	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten I-Typ Lektine (Siglecs) bezüglich ihrer Expression auf verschiedenen Zellen und ihrer Bindungspräferenzen an spezifische Sialinsäure-haltige Glykane	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3: Geräte	19
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer	22
Tabelle 6: Reaktions-Kits	22
Tabelle 7: Antikörper	22
Tabelle 8: Glykokonjugate	23
Tabelle 9: Rekombinante Proteine	24
Tabelle 10: Isotypen	25
Tabelle 11: Materialien für die Zellkultur	25
Tabelle 12: Enzyme und Enzympuffer	26
Tabelle 13: Verwendete Vektoren, Plasmide und cDNA	27
Tabelle 14: Verwendete Softwareprogramme	28
Tabelle 15: Volumina der eingesetzten Reagenzien für die PCR zur Generierung der LEC-CARs	30
Tabelle 16: PCR-Programm zur Generierung der LEC-CARs	31
Tabelle 17: Volumina der eingesetzten Reagenzien für die Kolonie-PCR	32
Tabelle 18: Programm der Kolonie-PCR	32
Tabelle 19: Kultivierte humane Zelllinien und deren Verfügbarkeit	36
Tabelle 20: Medien und ihre Zusammensetzung	37
Tabelle 21: Zusammenfassung der Lektinbindung an spezifische Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche von verschiedenen frischen primären pädiatrischen und adulten Leukämieproben	52
Tabelle 22: Zusammenfassung der Lektinbindung an spezifische Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aus peripherem Blut verschiedener gesunder Spender	54

10 Vorveröffentlichungen

Im Folgenden sind die aus dieser Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen aufgelistet:

1. Franke, A. K., **Wessolowski, C.**, Thaden, V., Müller, I. & Cornils, K. 2023. Glyco-binding domain chimeric antigen receptors as a new option for cancer immunotherapy. *Gene Ther*, 30(7-8), 603-611.

Mein Eigenanteil an der oben genannten Publikation gestaltet sich wie folgt:

Planung, Datenerhebung und Datenauswertung der Degranulations-Tests, Erstellung der Abbildungen *Figure 4* und *Supplemental Figure 5*, Überarbeitung des Manuskripts.

2. Prasse, N., **Wessolowski, C.**, Müller, I., Cornils, K. & Franke, A. K. 2024. Glycan Structures in Osteosarcoma as Targets for Lectin-Based Chimeric Antigen Receptor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 25(10), 5344.

Mein Eigenanteil an der oben genannten Publikation gestaltet sich wie folgt:

Planung, Datenerhebung und Datenauswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung von peripheren Blutzellen und hämatopoetischen Stammzellen, Erstellung der Abbildung *Supplemental Figure S6 Teil A*.

11 Erklärung des Eigenanteils

Diese Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Sektion für Pädiatrische Stammzelltransplantation und Immunologie, in der Arbeitsgruppe und unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Ingo Müller durchgeführt. Die zusätzliche wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch PD Dr. Kerstin Cornils und Dr. Anna-Katharina Franke.

Die Konzeption und Planung dieser Arbeit erfolgten in Zusammenarbeit und regelmäßigen Austausch mit den oben genannten an der Betreuung beteiligten Personen und mir.

Alle Versuche und Daten, die nicht von mir durchgeführt und erhoben wurden, sind in den vorhergehenden Abschnitten an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet. Zur Übersicht sind diese hier noch einmal aufgeführt: Die Sanger-Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach entsprechender Vorbereitung über Microsynth Seqlab GmbH in Göttingen, Deutschland (s. Abschnitt 2.2.1.8). Die primären adulten Leukämieproben wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fiedler und PD Dr. Wellbrock (Hamburg) aufbereitet und in Kultur genommen, bevor durchflusszytometrische Oberflächenfärbungen durch mich erfolgten (s. Abschnitt 2.2.2.2). Die Zellsortierung wurde von Diplom-Ingenieur für Biotechnologie (FH) Arne Düsedau in der FACS Core Facility am Leibniz-Institut für Virologie (Hamburg) durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.2.7). Die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene und in Abbildung 11 gezeigte FACS-Analyse wurde von Dr. Anna-Katharina Franke durchgeführt und ausgewertet.

Alle anderen Versuchsdurchführungen, die Datenerhebung, Datenauswertung sowie die Erstellung der Abbildungen erfolgten eigenständig durch mich. Sämtliche statistische Analysen erfolgten ebenfalls eigenständig durch mich.

Die Dissertationsschrift wurde von mir selbstständig verfasst. Es wurden keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln dafür verwendet.

Der Eigenanteil an den aus dieser Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen ist in Abschnitt 10 angegeben. Die in diesem Zusammenhang publizierten Daten sind an den entsprechenden Stellen in dieser Arbeit gekennzeichnet.

12 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ingo Müller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, dieses interessante Projekt als meine Doktorarbeit in seinem Labor am Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum zu bearbeiten, bedanken. Vielen Dank für die stetige Unterstützung, die hervorragende Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und die vielen Anregungen zu meinem Projekt. Ich möchte mich auch für die Möglichkeit bedanken, an Kongressen teilzunehmen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Kerstin Cornils und Dr. Anna-Katharina Franke für die ständige Bereitschaft, Fragen zu beantworten, mein Projekt voranzubringen und Experimente durchzusprechen. Ich habe mich immer bestens betreut und aufgehoben gefühlt. Ich danke Dr. Anna-Katharina Franke für die geduldige und hervorragende Einarbeitung in die Labormethoden. Ich danke den beiden, dass sie mir nicht nur das wissenschaftliche Arbeiten und Denken gelehrt und ihre Erfahrung mit mir geteilt haben, sondern auch mein Allgemeinwissen abseits der Wissenschaft erheblich erweitert haben. Danke für die unglaubliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, für gemeinsames Lachen und aufbauende Worte. Danke, dass ich Teil des LEC-CAR-Teams werden durfte.

Marianne Klokow danke ich für die großartige Einarbeitung in die Laborarbeit, für das Beantworten aller dabei auftauchenden Fragen und für die hilfreichen Anregungen zu meinen Versuchsdurchführungen.

Bei Dr. Anne Kruchen möchte ich mich besonders für die Unterstützung und das offene Ohr bezüglich aller Fragen zum FACS bedanken, wenn der Canto oder der MacsQuant mal wieder andere Vorstellungen hatten als ich.

Wiebke Jünemann danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im und außerhalb vom Labor, für die vielen guten Gespräche, ihre ansteckende Motivation und gute Laune, ihre Ideen, für die Hilfsbereitschaft und gegenseitige Unterstützung und für die vielen unterhaltsamen Stunden in der Zellkultur.

Ich danke allen (auch ehemaligen) Mitgliedern der AG Müller, insbesondere Laura Rekowski, Isabelle Bley, Dr. Benjamin Schattling, Dr. Kerstin Schütze und Karlotta Bartels. Danke für die vielen interessanten fachlichen und außerfachlichen Gespräche, für die Diskussionen und Anregungen zu meinem Projekt, für die unglaubliche Hilfsbereitschaft, die gute Stimmung und Arbeitsatmosphäre im Labor und in den Büros sowie für die schönen Erlebnisse auch außerhalb des Labors.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler und PD Dr. Wellbrock danke ich für die Bereitstellung der adulten AML-Proben.

Ich danke der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, die mir durch die großzügige finanzielle Förderung in Form eines Promotionsstipendiums ermöglicht hat,

mich ein Jahr lang intensiv auf die experimentelle Forschung meiner Doktorarbeit zu konzentrieren.

Ein riesiger Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Schritten unterstützt, immer an mich glaubt, ein offenes Ohr, Verständnis und motivierende Worte für mich hat. Meinen Freunden danke ich für den Zusammenhalt, für die Ablenkung und für die gegenseitige Motivation. Benjamin danke ich für seine Unterstützung und Aufmunterungen, das Verständnis für lange Labortage und das geduldige Zuhören.

13 Anhang

13.1 Primer

Anhang-Tabelle I: Primer für die Klonierung

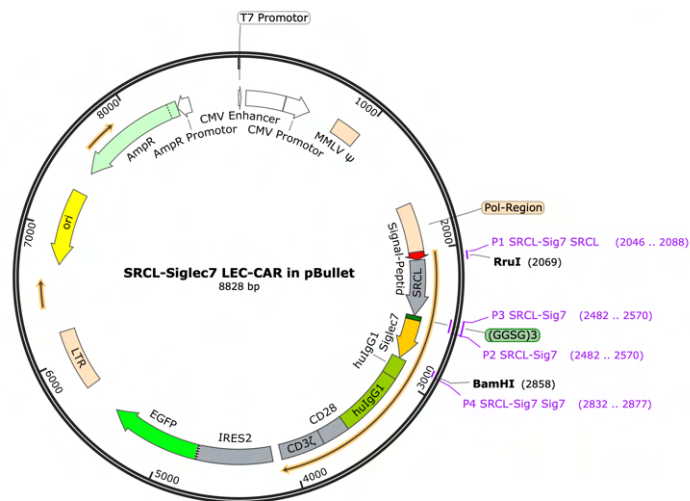
Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
P1 Sig7-SRCL Sig7	atcagtcctcagtcacatcatgtcg cgacagaagagtaaccggaag gattactcg	PCR 1 Fusion Siglec7-SRCL, Fusions-PCR Siglec7-SRCL, PCR Siglec7, PCR 1 Fusion Siglec7-SRCL Linker, PCR Siglec7 Linker
P2 Sig7-SRCL	ccggtgccggggttgaccaga accaccaccagaaccaccacc agaaccaccgaagtatctccc gcatcactca	PCR 1 Fusion Siglec7-SRCL
P3 Sig7-SRCL	tgagtgatgcggggagatacttc gggtggttctgggtggttctggtg gtggttctggtccaaccccgga ccgg	PCR 2 Fusion Siglec7-SRCL
P4 Sig7-SRCL SRCL	atttgggctcggcgggatcccct aatgcagatgacagtactgtctc cct	PCR 2 Fusion Siglec7-SRCL, Fusions-PCR Siglec7-SRCL, PCR SRCL
P1 SRCL-Sig7 SRCL	atcagtcctcagtcacatcatgtcg cgaccaaccccggcaccgg	PCR 1 Fusion SRCL-Siglec7, Fusions-PCR SRCL-Siglec7, PCR SRCL, PCR 1 Fusion SRCL-Siglec7 Linker, PCR SRCL Linker
P2 SRCL-Sig7	cgagtaatccttccggttactcttct gaccagaaccaccaccagaac caccaccagaaccacctaagc agatgacagtactgtctccc	PCR 1 Fusion SRCL-Siglec7
P3 SRCL-Sig7	gggagacagtactgtcatctgca ttaggtggttctgggtggttctg gtggtggttctggtcagaagagt aaccggaaggattactcg	PCR 2 Fusion SRCL-Siglec7
P4 SRCL-Sig7 Sig7	atttgggctcggcgggatccccg aagtatctccccgcatcactcat	PCR 2 Fusion SRCL-Siglec7, Fusions-PCR SRCL-Siglec7, PCR Siglec7
P1 Sig7-SRCL Sig7 Myc	atcagtcctcagtcacatcatgtcg cgagaacaaaaactcatctcag aagaggatctgcagaagagta accggaaggattactcg	PCR 1 Fusion Siglec7-SRCL Linker Myc, PCR Siglec7 Linker Myc
P2 Sig7-SRCL Linker	ccggtgccggggttgccgaccct ccgcctccgctaccgcctccacc	PCR 1 Fusion Siglec7-SRCL Linker und Linker Myc

	agagcctcctccaccgaagtatc tccccgcatcactca	
P3 Sig7-SRCL Linker	ggtagcggaggcggagggtcg ccaacccccggcaccgg	PCR 2 Fusion Siglec7-SRCL Linker und Linker Myc
P4 Sig7-SRCL SRCL Linker	atttgggctcggcgggatcccc gaccctcgcctccgctaccgcc tccaccagagcctcctccaccta atgcagatgacagtactgtctcc ct	PCR 2 Fusion Siglec7-SRCL Linker und Linker Myc, PCR SRCL Linker und Linker Myc
P1 SRCL-Sig7 SRCL Myc	atcagtgcctcagtcacatgtcg cgagaacaaaaactcatctcag aagaggatctgccaacccccggc accgg	PCR 1 Fusion SRCL-Siglec7 Linker Myc, PCR SRCL Linker Myc
P2 SRCL-Sig7 Linker	cgagtaatccttcgggtactctt gacccgaccctccgctccgcta ccgctccaccagagcctcctcc acctaagcagatgacagtactg tctccc	PCR 1 Fusion SRCL-Siglec7 Linker und Linker Myc
P3 SRCL-Sig7 Linker	gtagcggaggcggagggtcg gtcagaagagtaaccggaagg attactcg	PCR 2 Fusion SRCL-Siglec7 Linker und Linker Myc
P4 SRCL-Sig7 Sig7 Linker	atttgggctcggcgggatcccc gaccctcgcctccgctaccgcc tccaccagagcctcctccaccg aagtatctccccgcatcactcat	PCR 2 Fusion SRCL-Siglec7 Linker und Linker Myc, PCR Siglec7 Linker und Linker Myc
LEC-CAR.for	aatcagtgcctcagtcacatgtc g	Fusions-PCR für alle Fusions- Konstrukte mit Linker und Linker Myc
LEC-CAR.rev	atttgggctcggcggg	Fusions-PCR für alle Fusions- Konstrukte mit Linker und Linker Myc

Anhang-Tabelle II: Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung

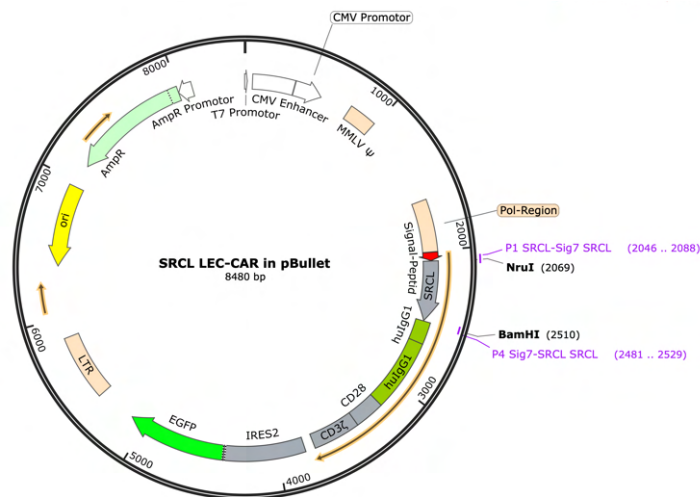
Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
FG33pBullet_pol_fw	cttcctgaccctgacatga	Kolonie-PCR, Sequenzierung pBullet
FG34pBullet_hlgG_rv	ggagatcatgagggtgtcct	Kolonie-PCR, Sequenzierung pBullet
pJET1.2 for	cgactcactataggagagcggc	Kolonie-PCR, Sequenzierung pJET
pJET1.2 rev	aagaacatcgattttcatggcag	Kolonie-PCR, Sequenzierung pJET
EGFP Rev	ggtcagcttgccgtaggtg	Sequenzierung pBullet
p73	ggggcggaatttacgtagc	Sequenzierung pBullet
LEC-CAR.for	aatcagtgcctcagtcacatgtcg	Sequenzierung pBullet
LEC-CAR.rev	atttgggctcggcggg	Sequenzierung pBullet

13.2 Vektorkarten

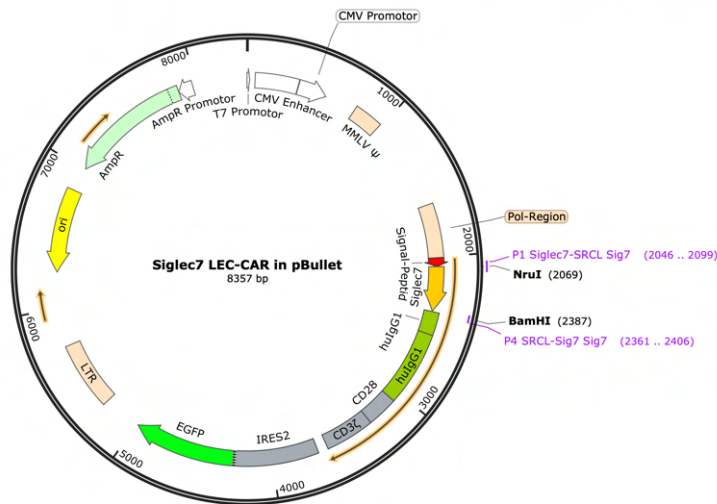


Anhang 1 Lage der zur Klonierung des SRCL-Siglec7 LEC-CARs im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL-Siglec7 LEC-CAR besteht aus den beiden Lektin-Domänen SRCL und Siglec7 und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL, P2 SRCL-Sig7, P3 SRCL-Sig7 und P4 SRCL-Sig7 Sig7 mittels (Fusions-)PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt.

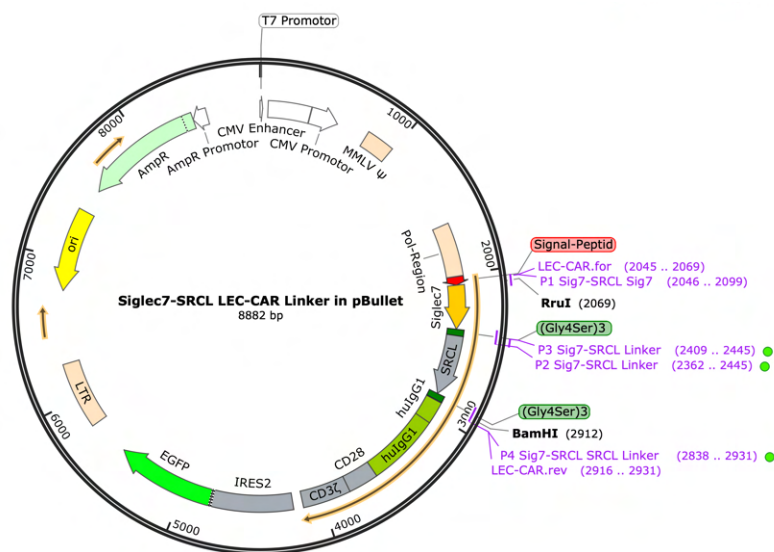
(GGSG)3 = Glycin-Serin-Linker, huIgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = long terminal repeats, ori = Replikationsursprung, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus



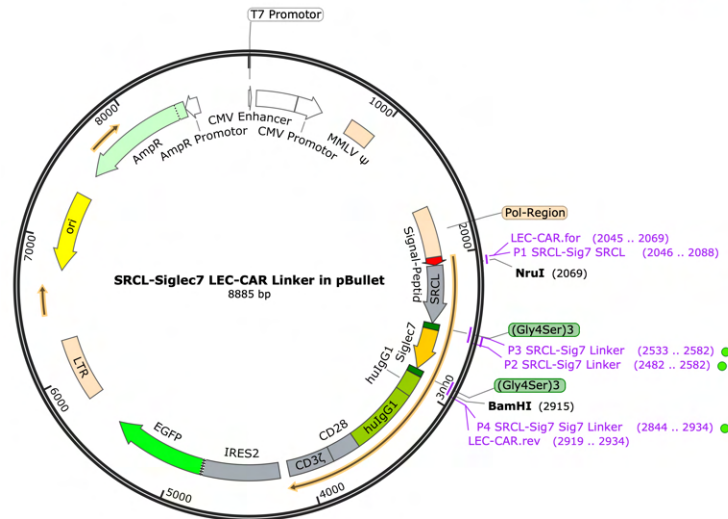
Anhang 2 Lage der zur Klonierung des SRCL LEC-CARs im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL LEC-CAR besteht aus der Lektin-Domäne SRCL und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL und P4 Sig7-SRCL SRCL mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. huIgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = long terminal repeats, ori = Replikationsursprung, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus



Anhang 3 Lage der zur Klonierung des Siglec7 LEC-CARs im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten Siglec7 LEC-CARs besteht aus der Lektin-Domäne Siglec7 und wurde mit den Primern P1 Siglec7-SRCL Sig7 und P4 SRCL-Sig7 Sig7 mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = long terminal repeats, ori = Replikationsursprung, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus

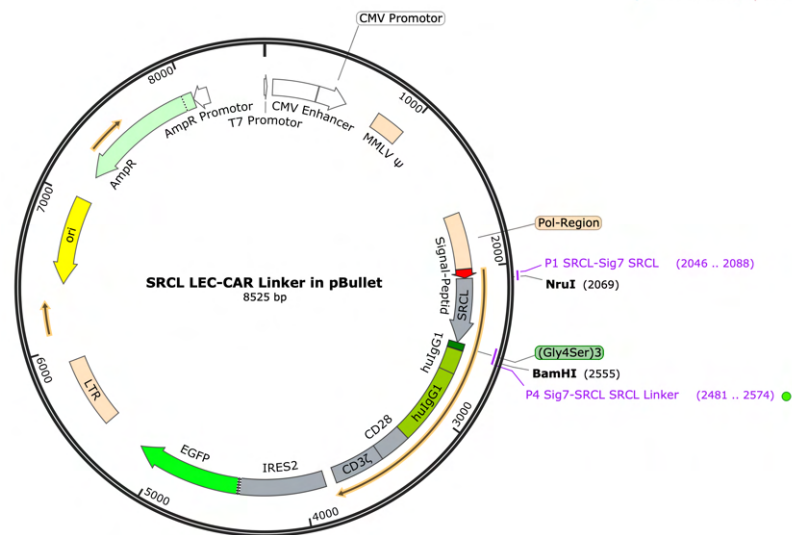


Anhang 4 Lage der zur Klonierung des Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker besteht aus den beiden Lektin-Domänen Siglec7 und SRCL und wurde mit den Primern P1 Sig7-SRCL Sig7, P2 Sig7-SRCL Linker, P3 Sig7-SRCL Linker, P4 Sig7-SRCL SRCL Linker mittels PCR und den Primern LEC-CAR.for und LEC-CAR.rev mittels Fusions-PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = long terminal repeats, ori = Replikationsursprung, MMLV = Moloney Murine Leukemia Virus

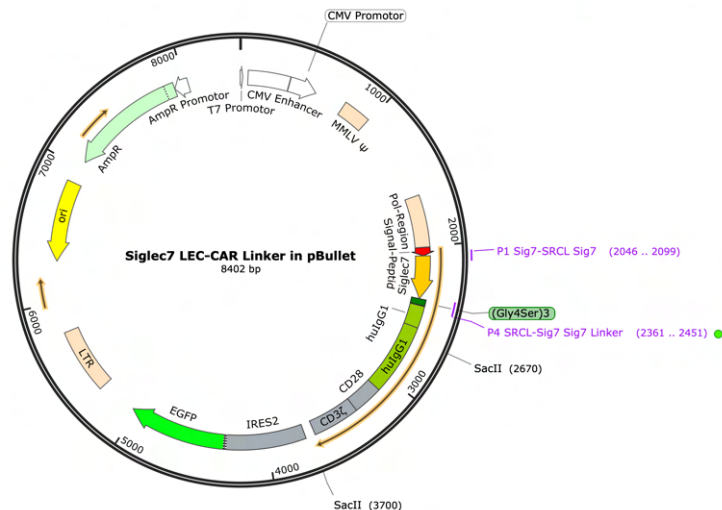


Anhang 5 Lage der zur Klonierung des SRCL-Siglec7 LEC-CAR Linker im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL-Siglec7 LEC-CAR Linker besteht aus den beiden Lektin-Domänen Siglec7 und SRCL und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL, P2 SRCL-Sig7 Linker, P3 SRCL-Sig7 Linker, P4 SRCL-Sig7 Sig7 Linker mittels PCR und den Primern LEC-CAR.for und LEC-CAR.rev mittels Fusions-PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt.

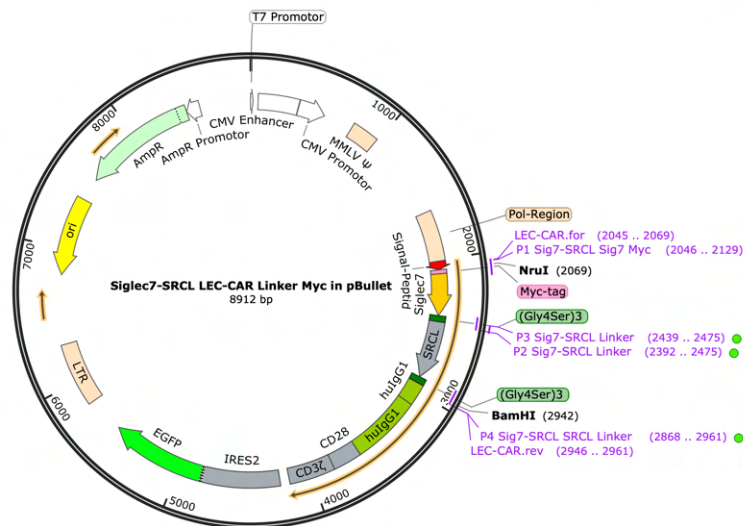
(Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, huIgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*



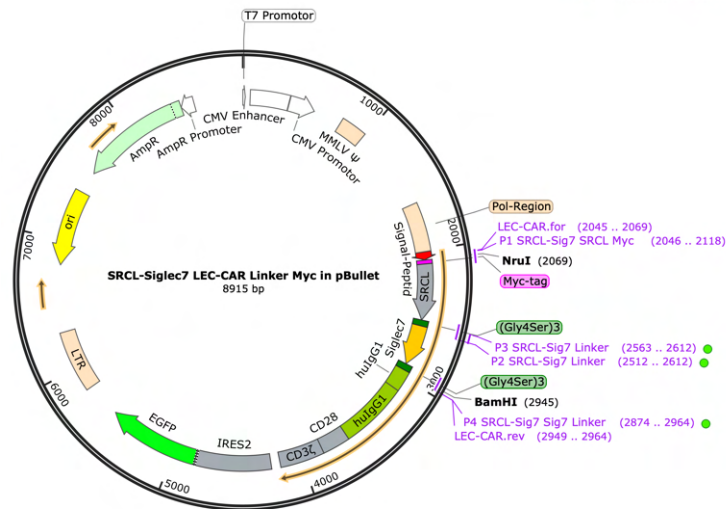
Anhang 6 Lage der zur Klonierung des SRCL LEC-CAR Linker im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL LEC-CAR Linker besteht aus der Lektin-Domäne SRCL und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL und P4 Sig7-SRCL SRCL Linker mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, huIgG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*



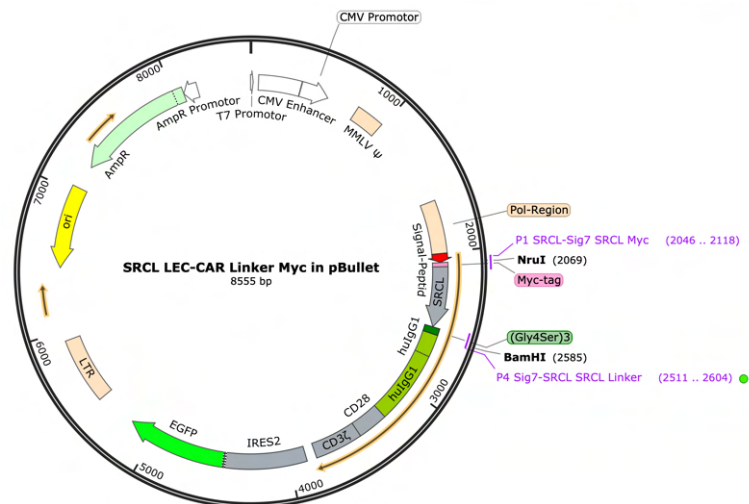
Anhang 7 Lage der zur Klonierung des Siglec7 LEC-CAR Linker im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten Siglec7 LEC-CAR Linker besteht aus der Lektin-Domäne Siglec7 und wurde mit den Primern P1 Sig7-SRCL Sig7 und P4 SRCL-Sig7 Sig7 Linker mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*



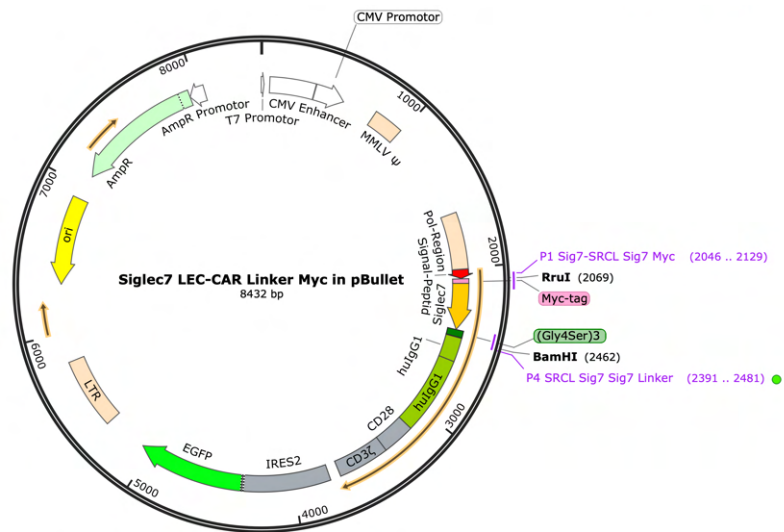
Anhang 8 Lage der zur Klonierung des Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker Myc im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten Siglec7-SRCL LEC-CAR Linker Myc besteht aus den beiden Lektin-Domänen Siglec7 und SRCL und wurde mit den Primern P1 Sig7-SRCL Sig7 Myc, P2 Sig7-SRCL Linker, P3 Sig7-SRCL Linker, P4 Sig7-SRCL SRCL Linker mittels PCR und den Primern LEC-CAR.for und LEC-CAR.rev mittels Fusions-PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt. (Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*



Anhang 9 Lage der zur Klonierung des SRCL-Siglec7 LEC-CAR Linker Myc im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL-Siglec7 LEC-CAR Linker Myc besteht aus den beiden Lektin-Domänen Siglec7 und SRCL und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL Myc, P2 SRCL-Sig7 Linker, P3 SRCL-Sig7 Linker, P4 SRCL-Sig7 Sig7 Linker mittels PCR und den Primern LEC-CAR.for und LEC-CAR.rev mittels Fusions-PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt.
(Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*



Anhang 10 Lage der zur Klonierung des SRCL LEC-CAR Linker Myc im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten SRCL LEC-CAR Linker Myc besteht aus der Lektin-Domäne SRCL und wurde mit den Primern P1 SRCL-Sig7 SRCL Myc und P4 Sig7-SRCL SRCL Linker mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt.
(Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*

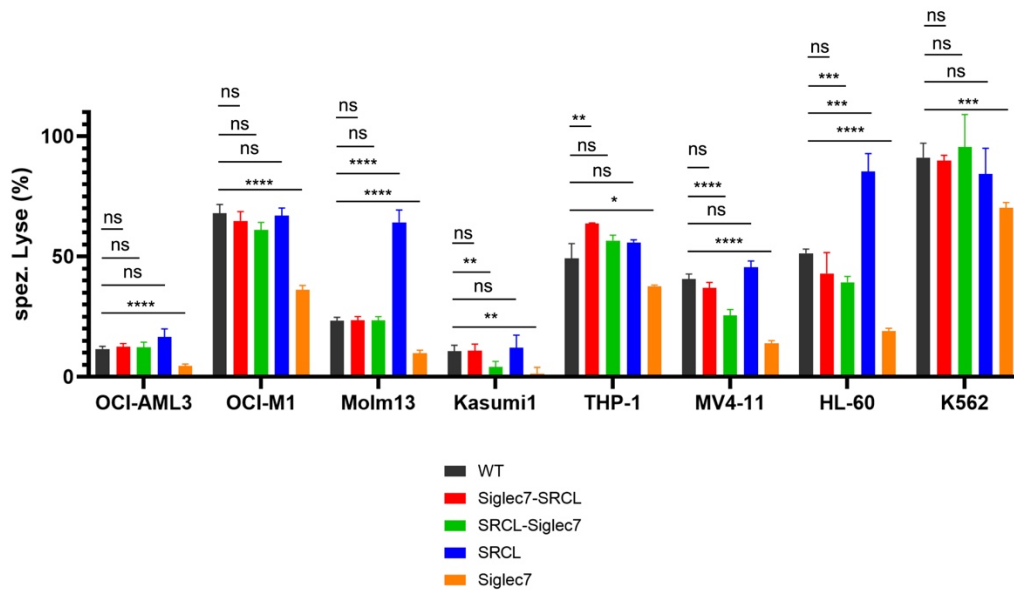


Anhang 11 Lage der zur Klonierung des Siglec7 LEC-CAR Linker Myc im γ -retroviralen pBullet Vektor verwendeten Primer. Das Insert des hier gezeigten Siglec7 LEC-CAR Linker Myc besteht aus der Lektin-Domäne Siglec7 und wurde mit den Primern P1 Sig7-SRCL Sig7 Myc und P4 SRCL-Sig7 Sig7 Linker mittels PCR generiert. Über die Schnittstellen NruI (synonym RruI) und BamHI wurde das CAR-Konstrukt in den pBullet Vektor mittels Restriktion und Ligation eingebracht. Das CAR-Konstrukt ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verknüpft. Der Vektor enthält zusätzlich einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) zur Expression in eukaryotischen Zellen und einen T7-Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Expression und Selektion in *E.coli*. Die Abbildung wurden mit SnapGene® erstellt.

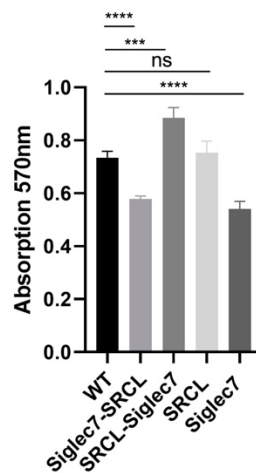
(Gly4Ser)3 = Glycin-Serin-Linker, hulG1 = humanes Immunglobulin G1, LTR = *long terminal repeats*, ori = Replikationsursprung, MMLV = *Moloney Murine Leukemia Virus*

13.3 Versuchsreplikate

A

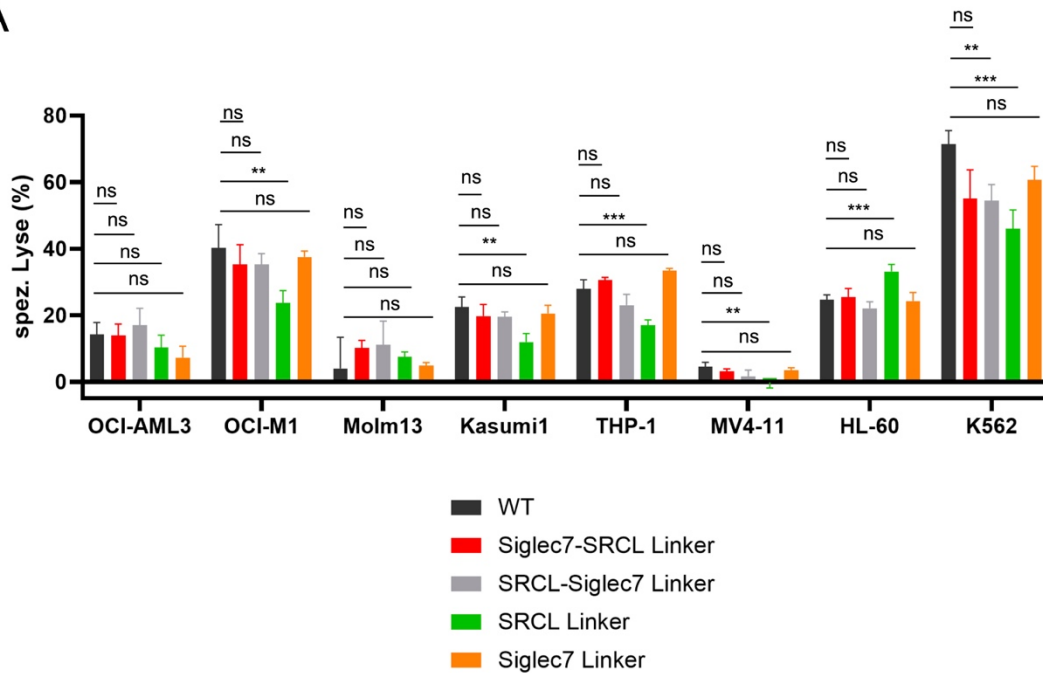


B

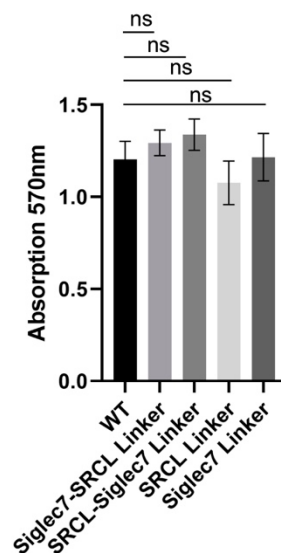


Anhang 12 Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs ohne Linker – Versuchswiederholung I. (A) Wildtyp und Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1 mit den angegebenen Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Balken stellen Mittelwerte von Quadruplikaten dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

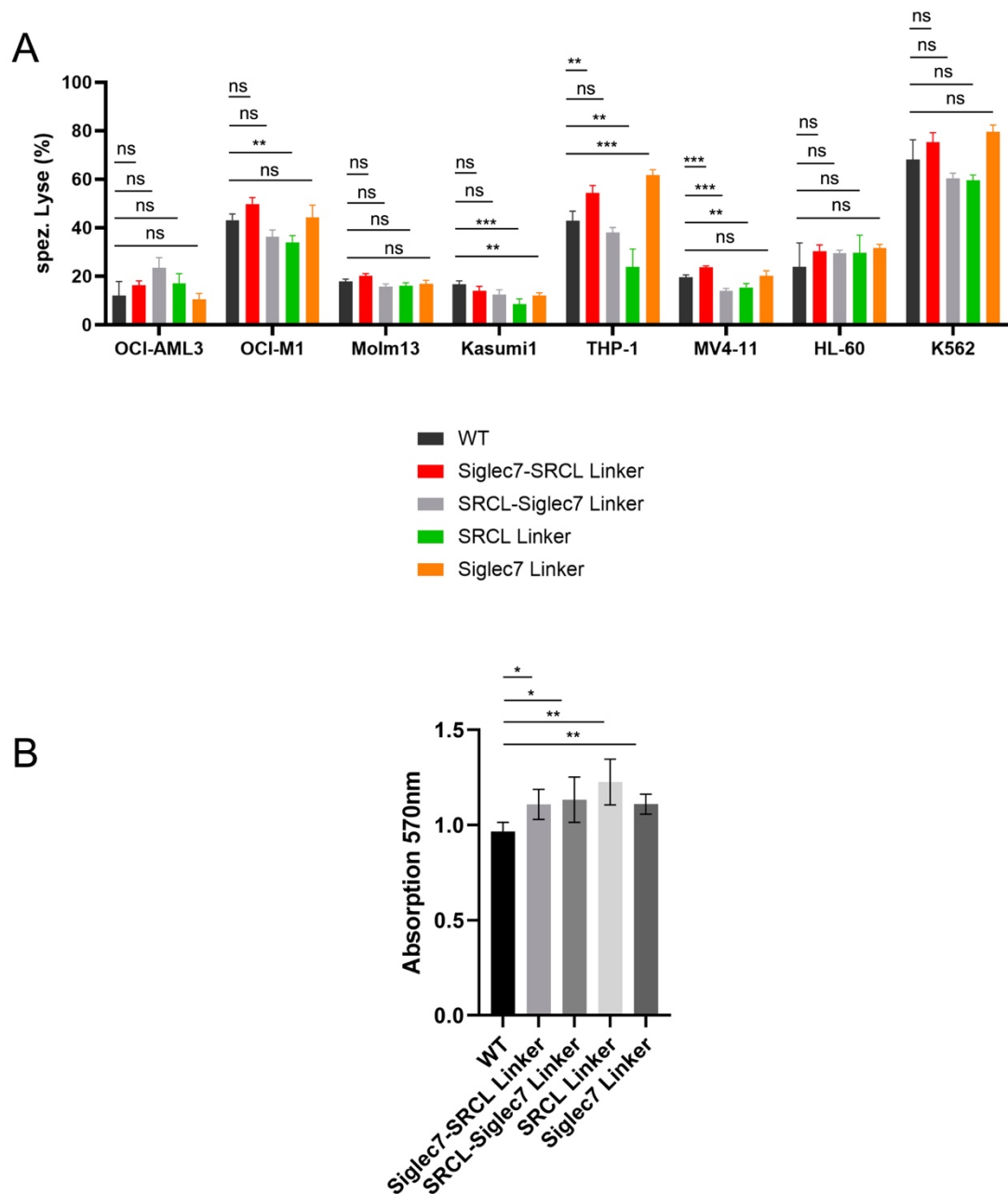
A



B

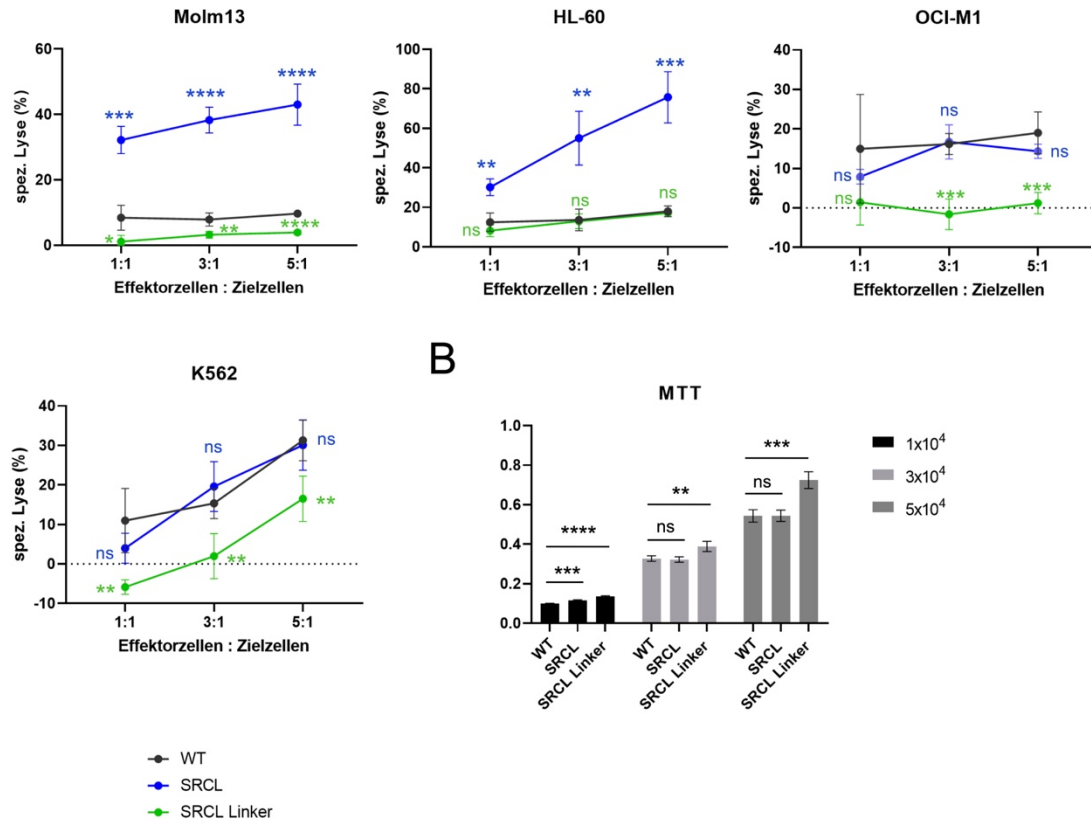


Anhang 13 Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs mit Linker – Versuchswiederholung I. (A) Wildtyp und Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1 mit den angegebenen Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Balken stellen Mittelwerte von mindestens Triplikaten dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant



Anhang 14 Zytotoxizität und MTT von LEC-CARs mit Linker – Versuchswiederholung II. (A) Wildtyp und Siglec7-SRCL, SRCL-Siglec7, SRCL und Siglec7 LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1 mit den angegebenen Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Balken stellen Mittelwerte von mindestens Triplikaten dar, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

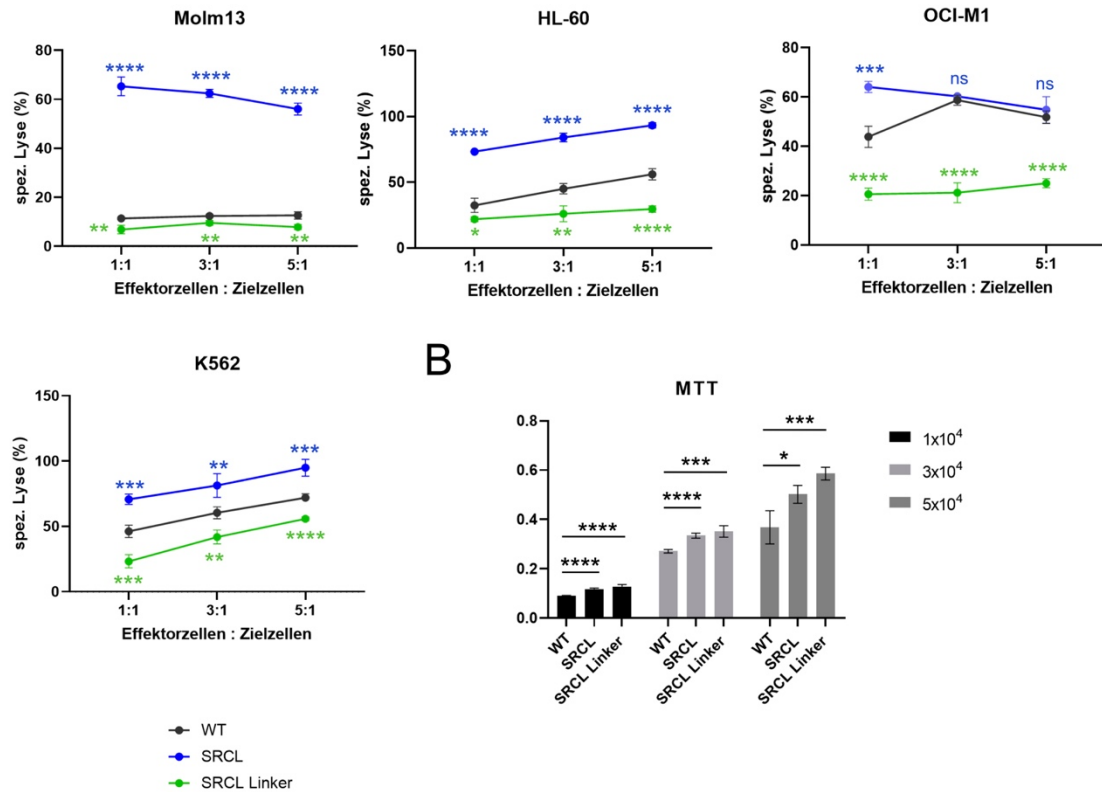
A



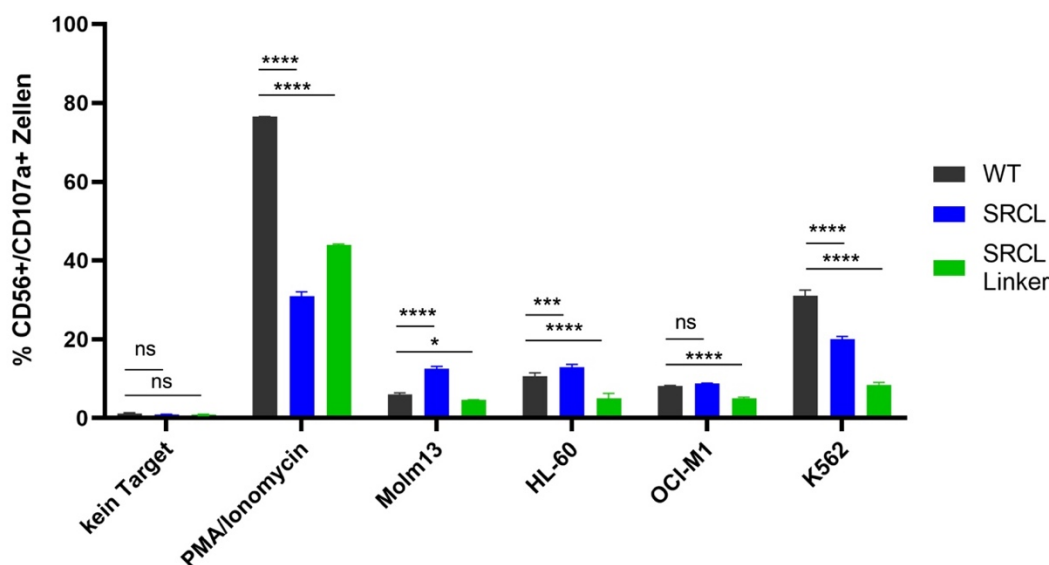
B

Anhang 15 Zytotoxizität und MTT-Assay von SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker – Versuchswiederholung I. (A) Wildtyp und SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in den angegebenen Effektor-Zielzell-Ratios mit den Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens Triplikaten, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Standardabweichung ist nicht dargestellt, wenn diese kleiner als der Datenpunkt ist. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht significant

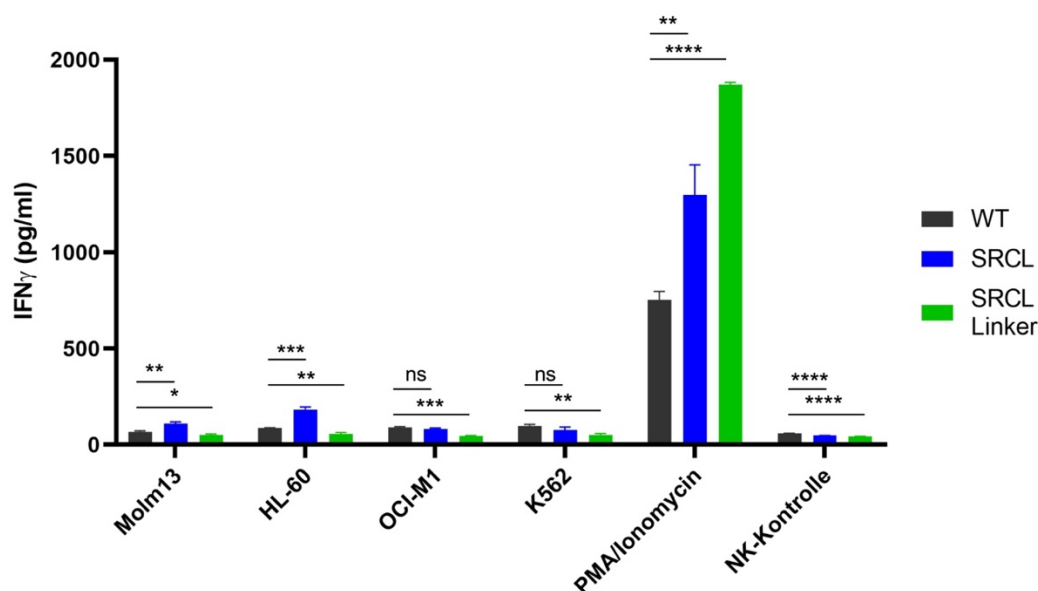
A



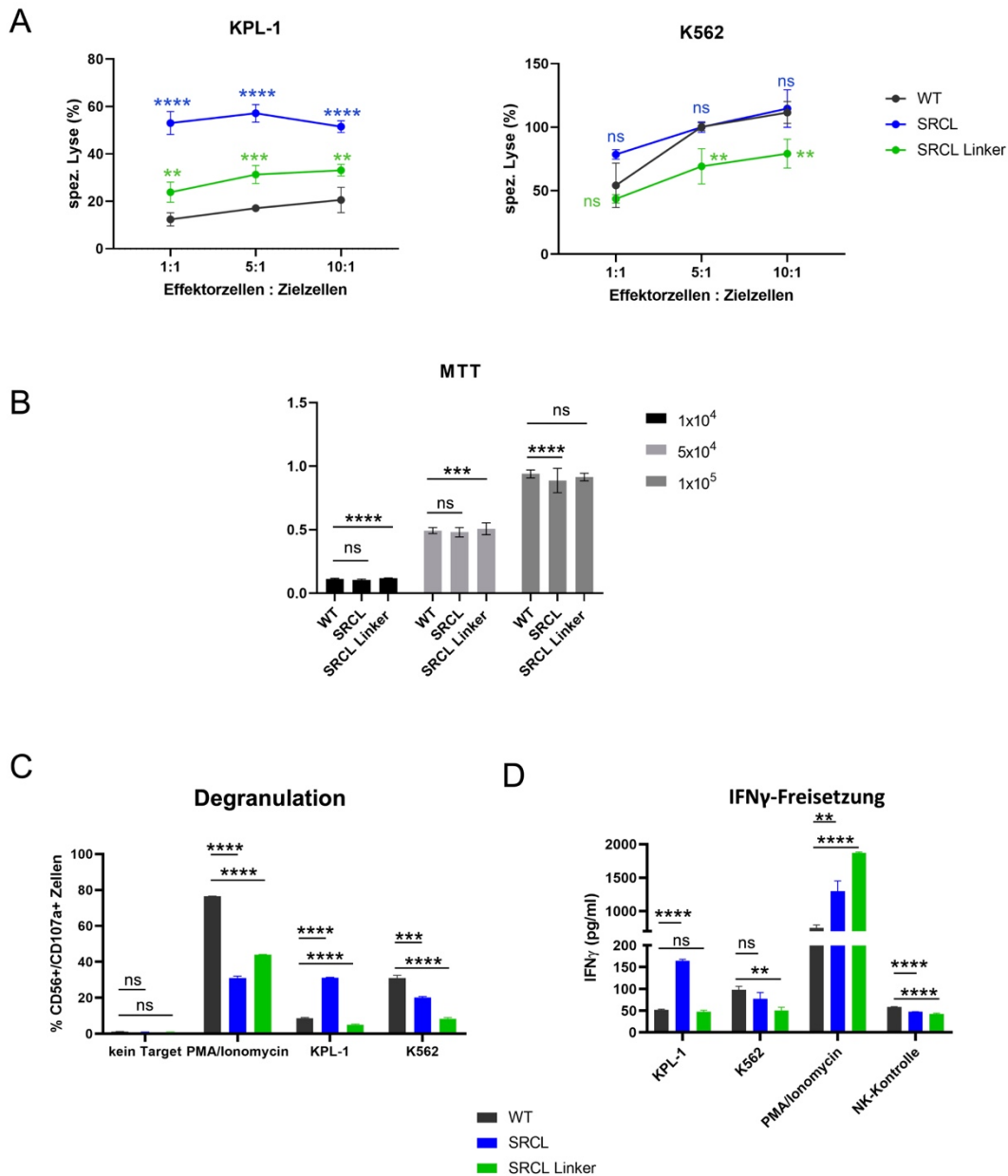
Anhang 16 Zytotoxizität und MTT-Assay von SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker – Versuchswiederholung II. (A) Wildtyp und SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in den angegebenen Effektor-Zielzell-Ratios mit den Calcein-gefärbten Leukämiezelllinien Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Angegeben sind die Mittelwerte von mindestens Triplikaten, der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung an. Die Standardabweichung ist nicht dargestellt, wenn diese kleiner als der Datenpunkt ist. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns = nicht signifikant



Anhang 17 Degranulation der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker – Versuchswiederholung I. Die CD107a-Expression auf der Oberfläche der Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen (CD56-positiv) wurde durchflusszytometrisch nach IL-2 Stimulation über Nacht und dreistündiger Inkubation mit Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 bestimmt. Effektorzellen mit Inkubation von Medium (kein Target) und PMA/Ionomycin dienten als Kontrollen für die minimale und maximale Degranulation. Gezeigt ist die Analyse der Degranulation der CD56-positiven, CD107a-positiven Effektorzellen in Prozent. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (Balken stellen Mittelwerte von Triplikaten dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes). Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant



Anhang 18 IFN γ -Freisetzung der NK92-Zellen mit SRCL LEC-CAR mit und ohne Linker – Versuchswiederholung I. Die IFN γ -Freisetzung wurde im Überstand nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und Inkubation der Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen mit Molm13, HL-60, OCI-M1 und K562 über 22 Stunden bestimmt. PMA/Ionomycin diente als Kontrolle für die maximale IFN γ -Freisetzung und NK-Zellen ohne Zielzellen als Kontrolle für die minimale IFN γ -Freisetzung. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (Balken stellen Mittelwerte von Triplikaten dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes). Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant



Anhang 19 Zytotoxizität, Degranulation und IFN γ -Freisetzung des SRCL-LEC-CARs mit und ohne Linker gegenüber KPL-1 – Versuchswiederholung I. (A) Wildtyp und SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker tragende NK92-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-2 in den angegebenen Effektor-Zielzell-Ratios mit den Calcein-gefärbten Zelllinien KPL-1 und K562 für vier Stunden inkubiert. (B) MTT-Versuch mit der gleichen Anzahl von Effektorzellen wie im Zytotoxizitäts-Versuch. (C) Die CD107a-Expression auf der Oberfläche von Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen (CD65 positiv) wurde durchflusszytometrisch nach IL-2 Stimulation über Nacht und dreistündiger Inkubation mit KPL-1 und K562 bestimmt. Effektorzellen mit Inkubation von Medium (kein Target) und PMA/Ionomycin dienten als Kontrollen für die minimale und maximale Degranulation. Gezeigt ist die Analyse der Degranulation der CD56-positiven, CD107a-positiven Effektorzellen in Prozent. (D) Die IFN γ -Freisetzung wurde im Überstand nach Stimulation mit IL-2 über Nacht und Inkubation der Wildtyp, SRCL LEC-CAR und SRCL LEC-CAR Linker NK92-Zellen mit KPL-1 und K562 über 22 Stunden bestimmt. PMA/Ionomycin diente als Kontrolle für die maximale IFN γ -Freisetzung und NK-Zellen ohne Zielzellen als Kontrolle für die minimale IFN γ -Freisetzung. Dargestellt in B, C, D und E ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (angegeben sind die Mittelwerte von mindestens Triplikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes an). Die Standardabweichung ist nicht dargestellt, wenn diese kleiner als der Datenpunkt ist. Signifikanzanalyse: ungepaarter T-Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift