

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG EINES HLA-DP SPEZIFISCHEN T-ZELL REZEPTORS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Zwerger

2018



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG EINES HLA-DP SPEZIFISCHEN T-ZELL REZEPTORS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Zwerger

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Simone Thomas

2. Berichterstatter: PD Dr. Corinna Seliger-Behme

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2018

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Die akute myeloische Leukämie</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4 Spenderauswahl in der Stammzelltransplantation</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 Die Rolle der T-Zellen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6 T-Zell Immunologie</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7 Donor lymphocyte infusion (DLI) und adoptive T-Zell Therapie</b> .....	<b>21</b>
<b>2.8 HLA-DP Antigene</b> .....	<b>23</b>
<b>2.9 HLA-DP als Zielstruktur des <i>Graft versus Leukemia</i> Effekt</b> .....	<b>24</b>
<b>2.10 Herstellung von HLA-DP spezifischen T-Zellen</b> .....	<b>25</b>
<b>2.11 Charakterisierung des HLA-DP spezifischen T-Zell Rezeptors TZR<sub>11C12</sub></b> <b>26</b>	<b>26</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Materialliste</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Laborgeräte .....	27
3.1.2 Verbrauchsgüter .....	28
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	29
3.1.4 Antikörper .....	30
3.1.5 Kits.....	30
3.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze.....	30
3.1.7 Zellkulturmedien .....	31
3.1.8 Puffer und Lösungen .....	32
3.1.9 Zytokine .....	32
3.1.10 Desinfektionsmittel.....	32
3.1.11 Enzyme.....	32
3.1.12 Nucleotide und Oligonukleotide .....	33
3.1.13 Peptide.....	33
3.1.14 Tetramere .....	33
3.1.15 Vektoren .....	33
3.1.16 Software.....	33
<b>3.2 Klonierung der HLA-DP Ketten</b> .....	<b>34</b>
3.2.1 Ficoll-Dichtezentrifugation .....	34
3.2.2 Isolation von RNA aus PBMC.....	34
3.2.3 Klonierung der HLA-DP Ketten.....	35
3.2.4 Transformation der Plasmid-DNA.....	36
3.2.5 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterienzellen .....	37
3.2.6 Amplifikation von Plasmid-DNA.....	37
3.2.7 Linearisierung der DNA .....	38
3.2.8 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Plasmid DNA .....	38
3.2.9 <i>In-vitro</i> Transkription von mRNA.....	38
<b>3.3 Zellkultur</b> .....	<b>40</b>
3.3.1 Kulturbedingungen.....	40
3.3.2 Verwendete Zelllinien .....	40
<b>3.4 Generation von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5 Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC</b> .....	<b>43</b>

3.6 Herstellung von Zelltrümmern/Zellresten durch die Freeze-Thaw Methode .....	43
3.7 Elektroporation .....	44
3.8 Durchflusszytometrie .....	44
3.9 ELISpot .....	45
4 Ergebnisse .....	46
4.1 Expressionsanalyse des TZR <sub>11C12</sub> .....	46
4.2 Test der drei AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und KG-1 auf ihre Erkennung durch TZR <sub>11C12</sub> elektroporierte T-Zellen .....	47
4.3 Test unterschiedlicher HLA-DPA1*01:03/-DPB1*04:01 exprimierender humaner Zelllinien auf ihre Erkennung durch TZR <sub>11C12</sub> .....	49
4.4 Nachweis von CLIP auf THP-1 .....	52
4.5 Test verschiedener HLA-DPA1*01:03/-DPB1*04:01 exprimierender Tierzelllinien auf ihre Erkennung durch TZR <sub>11C12</sub> .....	53
4.6 Überprüfung der Erkennung muriner dendritischer Zellen als Träger des HLA-DP .....	55
4.7 Test der häufig vorkommenden HLA-DPB Allele .....	57
4.8 Test unterschiedlicher HLA-DP Kettenpaarungen .....	60
4.9 Test verschiedener Kombinationen des T-Zell Rezeptors .....	63
4.10 Test der Alloreaktion von TZR <sub>11C12</sub> gegen typische GvHD-Zielstrukturen .....	65
4.11 Test artifizieller HLA-DP Tetramere auf Erkennung durch TZR <sub>11C12</sub> .....	67
4.12 Prüfung der Erkennung spezifisch beladener Peptide durch TZR <sub>11C12</sub> .....	68
5 Diskussion .....	71
5.1 HLA-DPB1*04:01-Spezifität von TZR <sub>11C12</sub> .....	71
5.2 Peptidunabhängigkeit von TZR <sub>11C12</sub> .....	75
5.3 Die Xenoreaktivität des TZR <sub>11C12</sub> .....	77
5.4 Peptidunabhängige Faktoren der Allo- und Xenoreaktion von TZR <sub>11C12</sub> ..	78
5.5 Klinische Aspekte von TZR <sub>11C12</sub> .....	78
5.6 Sicherheitsaspekte von TZR <sub>11C12</sub> .....	80
5.7 Zusammenfassung und Ausblick .....	83
6 Abkürzungsverzeichnis .....	85
7 Abbildungsverzeichnis .....	86
8 Tabellenverzeichnis .....	87
9 Literaturverzeichnis .....	87
10 Beiträge zu Kongressen .....	101
11 Danksagung .....	102

### 1 Abstract

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist ein kurativer Heilungsansatz der akuten myeloischen Leukämie. Werden Stammzellen transplantiert, die in 10/10 HLA kompatibel sind, liegen bei etwa 80% der Fälle Inkompatibilitäten des HLA-DPB1 Allels vor (1,2). Diese sind mit einer signifikanten Senkung der Leukämie-Rezidivrate assoziiert (3–5). Weil die T-Zellen der Spender normalerweise keine Toleranz für inkompatible HLA-DPB1 aufweisen (6), scheinen diese Antigene als mögliches Ziel einer adoptiven T-Zell Therapie im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation geeignet zu sein (7). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass HLA-DPB1 spezifische AML-reaktive zytolytische T-Lymphozyten, die aus naiven, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> selektierten T-Zellen gegen akute myeloische Leukämien mit 10/10 passenden HLA-Allelen stimuliert wurden, *in vitro* expandiert werden können (7). Diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen lysierten sehr effizient AML-Blasten *in vitro*, die das fehlgepaarte HLA-DPB1 Allel trugen. Zusätzlich konnte in immundefizienten NOD/SCID/IL2R $\gamma$ C<sup>-/-</sup> (NSG) Mäusen eine vollständige Eradikation HLA-DPB1 exprimierender AML-Blasten nachgewiesen werden (7).

Um die Herstellung von HLA-DPB1 reaktiven T-Zellen zu vereinfachen, wurde der T-Zell Rezeptor eines stark lytischen HLA-DPB1\*04:01 spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zell Klon (Klon 11C12) isoliert und anschließend in T-Zellen gesunder Spender transferiert. Die Feinanalyse dieses TZR<sub>11C12</sub> zeigt eine Kreuzreaktivität des Rezeptors gegen das HLA-DPB1\*04:02, das dem HLA-DPB1\*04:01 sehr ähnlich ist. Damit kann der Rezeptor in über 50% der Patienten für eine Therapie angewandt werden. Zusätzlich fand die Erkennung des Rezeptors unabhängig von der  $\alpha$ -Kette des HLA-DP statt, sodass die Zielstruktur von der  $\beta$ -Kette des HLA-DPA1\*01:03/ -DPB1\*04:01 ausgeht.

Nachdem der TZR zusätzlich ein breites Spektrum von HLA-DPB1\*04:01 exprimierenden hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen erkannte, wurde die Kreuzreaktivität von TZR<sub>11C12</sub> transfizierten T-Zellen gegenüber xenogenen Zellen überprüft, die zuvor mit HLA-DPB1\*04:01 kodierender mRNA transfiziert wurden. Hierbei zeigte sich eine HLA-DPB1\*04:01 spezifische Erkennung von Zellen verschiedener Spezies. Diese Daten lassen vermuten, dass der TZR<sub>11C12</sub> das HLA-DPB1\*04:01 peptidunabhängig erkennt.

Da TZR<sub>11C12</sub> ein großes Spektrum an nicht hämatopoetischen Zellen erkannte, wurden GvHD-Surrogatzellen aus Zelllinien humaner Leberzellen, Fibroblasten und Darmzel-

## **Abstract**

len nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung getestet, um die HLA-DP Expression heraufzuregulieren. In Anwesenheit von inflammatorischen Zytokinen zeigte sich eine Reaktivität gegen eine HLA-DPB1\*04:01 positive Fibroblastenzelllinie, sodass TZR<sub>11C12</sub> exprimierende T-Zellen in der Lage sind, eine HLA-DPB1\*04:01 spezifische GvHD im Patienten zu induzieren. Somit müssen für eine klinische Translation Sicherheitsmechanismen integriert werden, die eine solche GvHD Reaktivität verhindern oder diese nach Auftreten stoppen können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) trat in Deutschland im Jahr 2012 bei rund 1400 Patienten auf und machte etwa ein Viertel aller Leukämien aus (8). Auch wenn vor allem alte Menschen erkranken (8), tritt die Krankheit auch bei Kindern auf (9).

Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Entartung von Stammzellen des blutbildenden Systems, sodass klonale, abnormal und kaum differenzierte Zellen ungehemmt proliferieren. Diese infiltrieren Knochenmark, Blut und andere Organe des Patienten (10,11). Die klinischen Symptome wie etwa Anämie, Thrombopenie und Granulopenie entstehen durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese. Darüber hinaus können so viele Blasten im peripheren Blut auftreten, dass es zu einer Leukostase mit Durchblutungsstörungen kommt (12).

Risikofaktoren der Erkrankung sind Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, Zigarettenrauch, verschiedener Chemikalien (Benzole, Herbizide, Pestizide). Auch kongenitale Erkrankungen der Hämatopoese, genetische Syndrome sowie Therapien mit verschiedenen Chemotherapeutika wie Alkylantien, Topoisomerase II-Hemmern, Anthrazyklinen und Taxanen stellen Risiken dar. Die meisten Erkrankungen entstehen jedoch de novo (9).

Neben der Untersuchung eines Blutausstrichs umfasst die Diagnostik der AML die zytomorphologische und zytochemische Aufbereitung eines Knochenmarkaspirats, die Feststellung der Zelldifferenzierung durch Immunphänotypisierung sowie die zytogenetische und molekulargenetische Untersuchung der Leukämieblasten (13).

Das Krankheitsbild der AML kann auf verschiedene Art und Weise eingeteilt werden. Die Erkrankung wird in der älteren Einteilung der French-American-British-group (FAB) nach zytomorphologischen und zytochemischen Aspekten eingeteilt (12,14–16), was durch Immunphänotypisierung ergänzt werden kann (15). Dadurch lassen sich insgesamt 11 verschiedene Formen der AML in Gruppen (AML M0-M7) und Subgruppen definieren (Tab. 1) (14,15,17,18). Untersuchungen haben gezeigt, dass den verschiedenen Unterformen bestimmte zytogenetische Aberrationen und Mutationen zugeordnet werden können (12). Die Korrelation zwischen genetischer Aberration und morphologischer Form ist allerdings nicht verlässlich und hauptsächlich bei Vorliegen von t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) bedeutsam (19).

## Einleitung

AML	Bezeichnung	Häufigkeit
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	3,9%
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	18,8%
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	33,9%
M3	Akute Promyelozytenleukämie	3,8%
M3v		0,9%
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	18,0%
M4eo		5,8%
M5a	Akute monoblastische/ monozytäre Leukämie	4,8%
M5b		5,4%
M6	Akute Erythroleukämie	4,3%
M7	Akute Megakaryozytenleukämie	0,2%

Tabelle 1: **FAB-Klassifikation der AML**

In der Tabelle sind die Subtypen der AML nach FAB (12,15,17,18,20) mit ihrer Bezeichnung und Häufigkeit aufgetragen (20). Die AML M7 wurde 1985 (15) und die AML M0 1991 (18) in die Klassifikation aufgenommen.

Da die Einteilung in die von der FAB vorgeschlagenen Kriterien aufgrund vieler Erkenntnisse der Pathogenese und Molekulargenetik nicht mehr zeitgemäß ist, wurde eine neue Einteilung der AML durch die WHO vorgenommen (14,19). Diese vereint die zytomorphologischen, zytochemischen und immunphänotypischen Aspekte der FAB-Klassifikation mit zytogenetischen, biologischen und klinischen Aspekten (14,19). In der aktuellsten Fassung von 2008 (21), die 2016 überarbeitet wurde (22), lassen sich sechs Hauptgruppen abgrenzen (Tab. 2).

<p><b>AML with recurrent genetic abnormalities</b></p> <p>z.B. t(15;17)(q22;q12), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), AML mit mutiertem NPM1</p>
<p><b>AML with myelodysplasia-related changes</b></p> <p>aus MDS entstanden, ähnliche Zytogenetik wie MDS, über 50% in &gt;2 myeloischen Linien sind dysplastisch</p>
<p><b>Therapy related myeloid neoplasms</b></p>
<p><b>AML not otherwise specified</b></p> <p>AML mit minimaler Differenzierung/ AML ohne Differenzierung/ AML mit Differenzierung sowie zahlreiche Subtypen, die teilweise an die FAB-Klassifikation angelehnt sind</p>
<p><b>Myeloid sarcoma</b></p>
<p><b>Myeloid proliferations related to Down Syndrome</b></p> <p>auch transiente Blutbildveränderungen und MDS, die zum Down-Syndrom gehören</p>

Tabelle 2: **WHO-Klassifikation der AML von 2008 mit der Revision von 2016**

Dargestellt ist die Klassifikation der AML nach der Einteilung der WHO in der vierten Revision von 2008, modifiziert nach Vardiman et al. (21) mit den Aktualisierungen von 2016 (22).

## Einleitung

Die zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen der Leukämieblasten sind nicht nur diagnostisch, sondern auch prognostisch bedeutsam (10,13,23,24). Chromosomale Aberrationen haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Krankheitsprognose des Patienten (Tab. 3) (25). Grundsätzlich sind komplexe Karyotypen mit mehreren Veränderungen ungünstig (13), die bei etwa 10-14% der jüngeren und in 23% der älteren Patienten vorliegen (24).

Molekulargenetische Veränderungen können unabhängig von Chromosomenaberrationen auftreten, was bei etwa 50% der Patienten der Fall ist (26). Aktuell werden im klinischen Alltag verschiedene Mutationen zur Risikostratifikation im Rahmen der Diagnostik der akuten myeloischen Leukämie untersucht (25). Eine günstige Prognose zeigen beispielsweise Mutationen in NPM1 oder biallelisch in CEBPA (Tab. 3), die mit einer höheren Rate von Komplettremissionen sowie Rezidivfreiheit nach Chemotherapie assoziiert sind (10,13,25). Liegen hierbei zusätzliche Chromosomenaberrationen vor, scheint sich die Prognose nicht zu verändern (25). Mutationen in der Tyrosinkinase FLT3 müssen differenziert betrachtet werden und hängen von der klonalen Dominanz des Allels ab. Bei niedriger Allelrate von FLT-ITD und gleichzeitig vorliegender NPM1-Mutation verändert sich die gute Prognose nicht. Das Vorliegen einer hohen Genlast des Allels ist dagegen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tab. 3) (25,27). Andere untersuchte molekulargenetische Marker wie RUNX1, ASXL1 und TP53 werden als Risikomutationen der AML angesehen (25). Nach dem European LeukemiaNet (ELN) können die verschiedenen zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen in drei Risikogruppen unterteilt werden (Tab. 3) (10,13,25).

## Einleitung

Risikogruppe	Mutation
<i>Günstig</i>	t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder FLT3-ITD <sup>low</sup> Biallelisch mutiertes CEBPA
<i>Mittelgradig</i>	Mutiertes NPM1 und FLT3-ITD <sup>high</sup> Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>low</sup> (ohne andere Risikofaktoren) t(9;11)(p21.3, q23.3); MLLT3-KMT2A Zytogenetische Aberrationen, die noch nicht anders klassifiziert sind
<i>Ungünstig</i>	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); KMT2A neu angeordnet t(9;22)(q34.1; q11.2); BCR-ABL inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2-MECOM (EV11) -5 oder del(5q);-7; abnormales(17p); komplexer Karyotyp, monosomaler Karyotyp Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD <sup>high</sup> Mutiertes RUNX1/ ASXL1/ TP53

Tabelle 3: Übersicht von zytogenetischen Aberrationen der AML mit Risikoprofil nach European Leukemia-Net (Döhner et al. 2017 (25))

Die in der Übersicht nach dem European Leukemia Net aufgetragenen zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen wurden in klinischen Studien hinsichtlich ihres Risikos untersucht und sind modifiziert nach Döhner et al. (25) aufgetragen.

Daneben sind noch das Alter, die Zahl der Leukozyten bei Diagnosestellung, ein vorheriges myelodysplastisches Syndrom, vorangegangene Chemotherapien, Splenomegalie und die Höhe der LDH prognostisch relevant (13).

## 2.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie

In der Therapie der akuten myeloischen Leukämie wird zunächst mit Hilfe der sogenannten Induktionschemotherapie eine möglichst effektive Verringerung der Blastenzahl angestrebt. Dazu kommen vor allem die Chemotherapeutika Cytarabin in Kombination mit einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin) zum Einsatz (10,28,29). Bei entsprechender Mutation des FLT3-ITD ist zusätzlich der spezifische Inhibitor Midostaurin indiziert (25). Die genaue Dosierung sowie die Kombination mit weiteren Pharmaka ist aktuell Gegenstand vieler Studien, wobei sich bisher kein Induktionsschema als signifikant überlegen herausgestellt hat (10). Ziel der Induktionstherapie ist die sogenannte Komplettremission (KR) der Leukämie. Diese wird durch eine Infiltration von normozellulärem Knochenmark mit weniger als 5% Blasten ohne extramedulläre Blutbildung bei

## Einleitung

Granulozytenzahlen von  $>1000/\mu\text{l}$  und Thrombozytenzahlen von  $>100.000/\mu\text{l}$  im peripheren Blut definiert (30), was bei einem Großteil der Patienten erreicht werden kann (31).

Zur Erhaltung der Krankheitsremission schließt sich die sogenannte Konsolidierungstherapie an, da es ohne weitere Therapie faktisch immer zum Krankheitsrückfall kommt (32). Bei Patienten, die eine AML mit niedrigem Risiko aufweisen, besteht diese aus einer Hochdosistherapie mit Cytarabin (33). Liegt dagegen die intermediäre oder hohe Risikogruppe der AML nach ELN vor, so ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation Therapie der Wahl (10,25).

Patienten die sich aufgrund ihres Alters oder aufgrund von Komorbiditäten nicht für eine intensive Induktions- und Konsolidierungstherapie eignen, erhalten außerhalb von klinischen Studien eine supportive Therapie mit z.B. niedrigdosiertem Cytarabin oder hypomethylierenden Substanzen wie Azacitidin oder Decitabin (10,30,32,34).

Da trotz bester Therapie nur etwa ein Drittel aller Erkrankten nach 10 Jahren noch lebt (8) und ein Großteil der alten Erkrankten prognostisch ungünstige Formen der AML aufweist (35), wird intensiv an neuen Therapeutika gearbeitet. Neben anderen pharmakologischen Formulierungen der Chemotherapie ist es möglich, neu entstehende Proteine der Leukämieblasten gezielt anzugreifen. Ebenso befinden sich spezifische Antikörper in Entwicklung (Review in (25,36)).

### 2.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Durch die effektive Induktionstherapie kann in etwa 70% der Krankheitsfälle eine Komplettremission der Leukämie erzielt werden (31). Ohne eine suffiziente Postremissionstherapie ist der Krankheitsrückfall in vielen Fällen, gerade bei AML mit mittelgradigem und hohem Risiko, unvermeidlich (31,37). Daher sind effektive Strategien zur Vermeidung des Krankheitsrückfalls notwendig. Ein Lösungsansatz ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT), die meist in der ersten Phase der Komplettremission der Leukämie erfolgt (38). Grundsätzlich können zwei Arten der Transplantation unterschieden werden. Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten nach einer Hochdosischemotherapie eigene, vorher entnommene Stammzellen zur Rekonstitution der Hämatopoese gegeben. Diese Art der Transplantation spielt für die Therapie der AML allenfalls im Rahmen von Studien eine Rolle (10,39,40). Es konnte jedoch bislang kein absoluter Überlebensvorteil der Patienten gegenüber der Konsolidierungstherapie ohne autologe Transplantation nachgewiesen werden (41).

## Einleitung

Bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation stammen die verabreichten Zellen von einem fremden Spender oder Familienangehörigen. Ob diese Form der Therapie für den Patienten einen Vorteil bietet, muss im jeweiligen Einzelfall entschieden werden. Liegen Niedrigrisikomutationen wie etwa in NPM1 ohne FLT3-ITD vor, verringert sich nach der allogenen Transplantation das Überleben der Patienten (42). Patienten, die an Leukämieformen mit hohem oder intermediärem Risiko nach ELN erkrankt sind, profitieren hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Rückfallrate von der Transplantation (31,38). Außerdem bleibt die allogene Stammzelltransplantation bei primär therapierefraktärer AML der einzig kurative Therapieansatz (37). Vor der allogenen hämatopoetischen Transplantation wird das an Leukämie erkrankte Knochenmark des Patienten durch eine sogenannte Konditionierungstherapie möglichst vollständig zerstört. Das erzeugt eine ausreichende Immunsuppression für die Ansiedelung des neuen Immunsystems und zerstört den Großteil residueller Leukämieblasten (10). Dazu kommen unter anderem die beiden Alkylantien Busulphan und Cyclophosphamid sowie die Ganzkörperbestrahlung zum Einsatz (37). Ältere Patienten, für die diese sog. myeloablative Form der Konditionierungstherapie aufgrund ihres Allgemeinzustandes zu toxisch ist, erhalten weniger radikale nicht-myeloablative oder dosisreduzierte Konditionierungstherapien. Dabei ist die Rückfallrate der Leukämie höher, während die Transplantations-assoziierte Mortalität kleiner ist (43).

Das Prinzip der allogenen Transplantation basiert nicht nur auf der Eradikation verbleibender Blasten durch die Konditionierungstherapie, sondern vor allem auf der Eliminierung verbleibender Leukämieblasten (sog. Graft versus Leukämie (GvL) Effekt) durch das neue Immunsystem (37).

Nebenwirkungen der allogenen Stammzelltransplantation sind neben der Transplantat gegen Spender-Erkrankung (*Graft versus Host Disease* (GvHD)) auch die in der frühen Phase nach Transplantation notwendige Immunsuppression und die Organtoxizität der Chemotherapeutika (44,45). Die häufigsten Folgen der Chemotherapie sind Mukositis, das sinusoidale Verschlusssyndrom und Lungenschäden (45). Die Immunsuppression kann ein Aufflammen latenter Virusinfektionen und das Auftreten von opportunistischen Infektionen begünstigen (46). Trotz aller Bemühungen kommt es je nach Risikogruppe der AML zu Krankheitsrückfällen, die das Gesamtüberleben der Patienten stark vermindern (47).

### 2.4 Spenderauswahl in der Stammzelltransplantation

Zur Auswahl eines geeigneten und möglichst HLA-kompatiblen Stammzellspenders müssen Spender und Empfänger hinsichtlich der Histokompatibilitätsantigene (HLA) getestet werden. Diese sorgen im menschlichen Körper dafür, dass das Immunsystem fremde und eigene Strukturen unterscheiden kann. Aus Studien ist bekannt, dass für eine HSZT mit einem Überleben von 52% eine Übereinstimmung aller HLA-Klasse I (HLA-A, -B, -C) und des HLA-Klasse II HLA-DR notwendig sind (sog. 8/8 Match) (48). Nicht Übereinstimmungen (Inkompatibilitäten; sog. *Mismatch*) dieser Allele zwischen Patient und Spender sind mit einer höheren Rate an schwerer GvHD bei geringerer Rückfallrate assoziiert (49). Bei der Spenderauswahl ist die 8/8-Match Situation anzustreben, da sonst das Risiko der Transplantation den Nutzen überwiegt (48,50). Jedes nicht-*gematchte* Allel erniedrigt das Gesamtüberleben um ca. 10% (48). Lediglich der *Mismatch* eines der beiden Allele von HLA-DQ verändert die Überlebensrate nicht, bei Inkompatibilitäten beider Allele erhöht sich dagegen die Mortalität (50). Um das Komplikations- und Mortalitätsrisiko in Deutschland so niedrig wie möglich zu halten, wird daher ein 10/10-Match (d.h. Übereinstimmungen in den Allelen für HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ) angestrebt (50).

### 2.5 Die Rolle der T-Zellen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Nach der Stammzelltransplantation treten drei durch die transplantierten T-Lymphozyten vermittelte Effekte auf (Abb. 1). Der Transplantat gegen Infektion-Effekt (*Graft versus Infection-Effect* (Gvi)), der zur Kontrolle latenter Virusinfektionen nötig ist, ist oft nicht in der Lage, schwere Virusreaktivierungen und Infektionen im Rahmen der Transplantation zu verhindern (46,51). Neben antiviralen Medikamenten ist in dieser Situation eine Therapie über die *Donor-lymphocyte Infusion* (DLI) denkbar, bei der Spender T-Lymphozyten transfundiert werden (52).

## Einleitung

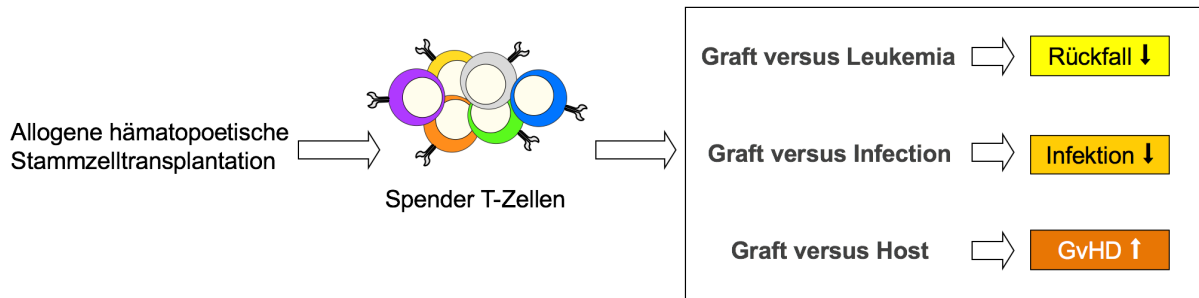


Abbildung 1: **Effekte der transfundierten Spender T-Lymphozyten**

Abgebildet sind die drei Haupteffekte nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Die übertragenen T-Zellen sind dazu imstande, verbleibende Leukämiezellen anzugreifen und zu zerstören. Latente Virusinfektionen können ebenfalls durch sie kontrolliert werden. Dennoch besitzen sie ein großes Potenzial, eine schwere Graft versus Host Disease in Patienten/-innen auszulösen.

Der Transplantat gegen Wirt Effekt (GvH), der maßgeblich von den transplantierten T-Zellen ausgeht, stellt eine der wesentlichen Komplikationen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation dar (44,53). Durch die Konditionierungstherapie, eventuelle Infektionen und die Grunderkrankung kann es zur Entstehung eines proinflammatorischen Milieus im geschädigten Gewebe kommen (44). In diesem werden antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen, aktiviert (44). Diese präsentieren Autoantigene des Empfängers, die durch die transplantierten T-Zellen als Alloantigene erkannt werden (53). Die transplantierten T-Zellen, von denen 1-10% potenziell alloreaktiv sind (54–56), können das HLA selbst oder HLA beladen mit Peptiden sogenannter minor-Antigene erkennen (53). Minor-Antigene sind Peptide endogener Proteine, deren Aminosäuresequenz sich aufgrund genetischer Polymorphismen zwischen Empfänger und Spender unterscheiden (57). Die Erkennung des allogenen HLA erfolgt entweder direkt durch die Bindung des intakten Proteins auf der Zelloberfläche oder indirekt durch Bindung eines präsentierten Peptids des allogenen HLA (58,59).

Nach der Aktivierung der T-Zellen und der klonalen Expansion kommt es zu einer Reaktion der Lymphozyten gegen die Alloantigen-tragenden Zellen und zur Induktion einer komplexen Reaktionskaskade, die zur weiteren Schädigung des Gewebes führt (44). Neben den T-Zellen spielen weitere Faktoren wie das unspezifische Immunsystem und B-Zellen eine Rolle für die Pathogenese (53,60–62). Das klinische Bild dieser Reaktion entspricht dem einer Autoimmunerkrankung. Von der bis ungefähr 100 Tage nach der Transplantation eintretenden akuten GvHD sind vor allem Leber, Darm und Haut betroffen (44,53). Die chronische GvHD ähnelt klinisch eher dem Krankheitsbild einer systemischen Sklerose und tritt etwa ab 100 Tagen nach der Transplantation auf (53).

## Einleitung

Die Heilungschancen durch die hämatopoetische Stammzelltransplantation beruhen auf dem Transplantat gegen Leukämie-Effekt (GvL) (63). Das transplantierte Immunsystem, insbesondere die T-Zellen des Spenders, richten sich dabei gegen die verbliebenen malignen Zellen. Da die Spender T-Zellen nicht spezifisch zwischen Leukämiezellen und gesunden Zellen der Patienten/-innen unterscheiden können, ist der GvL-Effekt mit dem Auftreten einer GvHD assoziiert (63,64). Es konnte gezeigt werden, dass bei Auftreten einer GvHD die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv der Leukämie geringer ist (65). Gleichzeitig steigt bei Patienten mit GvHD die Sterblichkeit im Zusammenhang mit der Transplantation (64). Damit die Nebenwirkungen und Rezidivhäufigkeiten nach HSZT minimiert werden können, wäre es wünschenswert, die gewünschte GvL-Reaktivität von der unerwünschten GvH-Reaktivität zu trennen. Um diese Gratwanderung erfolgreich zu bestehen, ist die Kenntnis geeigneter Zielstrukturen für eine T-Zell Antwort auf den Leukämiezellen nötig.

## 2.6 T-Zell Immunologie

Wesentliche Effekte der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation sowie wichtige Teile der spezifische Immunantwort gegen maligne Erkrankungen gehen von T-Lymphozyten aus (66,67). Diese lassen sich in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> positive Zellen aufteilen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen überprüfen kontinuierlich über die Bindung an HLA-Klasse I, ob eine Zelle ein z.B. von Virusproteinen oder Tumorproteinen abgeleitetes körperfremdes Peptid auf ihrer Oberfläche präsentiert (68) (Abb. 2).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind eine sehr heterogene Gruppe mit Zellen verschiedener Funktionen, die über die Bindung an HLA-Klasse II ihr Zielepitop erkennen. Sogenannte T<sub>H</sub>-Zellen sezernieren Zytokine und steuern damit die Immunantwort (69). T<sub>reg</sub>-Zellen sorgen für eine immunologische Toleranz und regulieren die Immunantwort herab (70). CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind außerdem beide in der Lage, zytotoxisch zu wirken (67,71) (Abb. 2).

## Einleitung

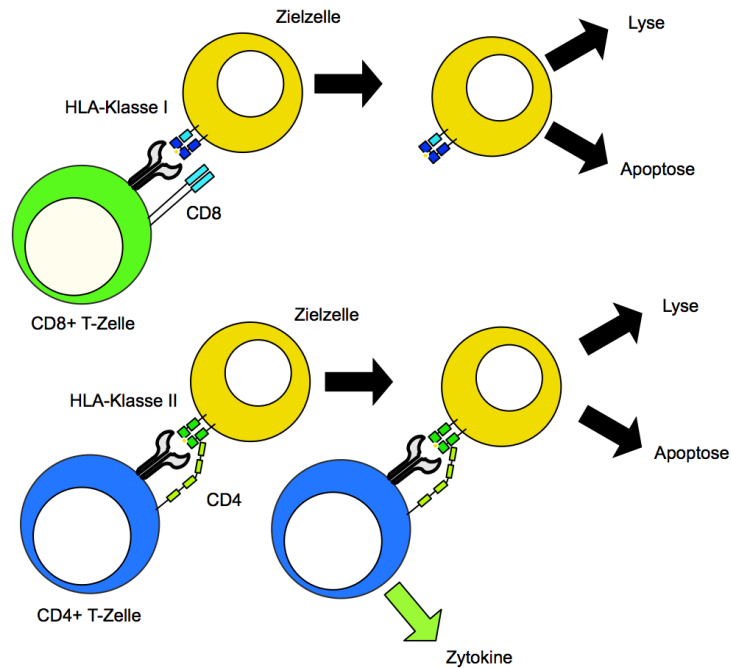


Abbildung 2: Überblick über die beiden T-Zell Gruppen

Schematische Darstellung beider Gruppen der T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> (blau) und CD8<sup>+</sup> (grün) T-Zellen. Die T-Zellen tragen jeweils einen TZR sowie den entsprechenden Korezeptor. Auf den Zielzellen (gelb) wird entweder HLA-Klasse I (oben) oder HLA-Klasse II (unten) exprimiert.

Die TZR, die den T-Lymphozyten die spezifische Antigenerkennung ermöglichen, werden in zwei Klassen aufgeteilt. Sogenannte  $\gamma:\delta$  TZR werden von Lymphozyten getragen, die an vielen Prozessen der Immunantwort beteiligt sein können und die mit vielen zellulären Akteuren interagieren. Die Bindung ihrer Zielstruktur ist, anders als bei der zweiten Gruppe der  $\alpha:\beta$  TZR nicht von einem HLA abhängig (Review in (72)).

Die meisten T-Lymphozyten tragen dagegen sogenannte  $\alpha:\beta$  TZR (73), zu denen auch TZR<sub>11C12</sub> gehört. Dieses Glykoprotein bildet an der Zelloberfläche ein Heterodimer aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des TZR. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des Rezeptors bestehen jeweils aus einer konstanten (C) und aus einer variablen (V) Domäne. Oberhalb der Zellmembran wird das Heterodimer mit Hilfe einer Disulfidbindung stabilisiert (55). Im Bereich der konstanten Domäne befindet sich die Transmembrandomäne, mit der der TZR in der Zellmembran verankert ist. Hier befindet sich auch die Stelle, an der die Interaktion des TZR mit den Strukturen des CD3, stattfindet, die zur Bildung des TZR-CD3 Komplexes notwendig ist (74) (Abb. 3 B). CD3 besteht aus den Heterodimeren CD3 $\delta\epsilon$  und CD3 $\gamma\epsilon$  sowie dem über eine Disulfidbrücke verbundenen Homodimer CD3 $\zeta\zeta$  (74,75). Es besitzt im Gegensatz zum TZR lange intrazelluläre Strukturen, an denen sich sogenannte *immunoreceptor tyrosine based motifs* (ITAMs) befinden (76) (Abb. 3 B). Nach der Aktivierung des TZR durch die Bindung des Antigens kommt es zu einer

## Einleitung

strukturellen Veränderung der ITAM von CD3, die eine Phosphorylierung und damit eine Bindung weiterer Proteine der Signalkaskade ermöglicht (76). Die Signalkaskade sorgt unter anderem für die Proliferation der Zelle, lässt Integrine affiner binden und ermöglicht einen Kalziumeinstrom in die Zelle (76).

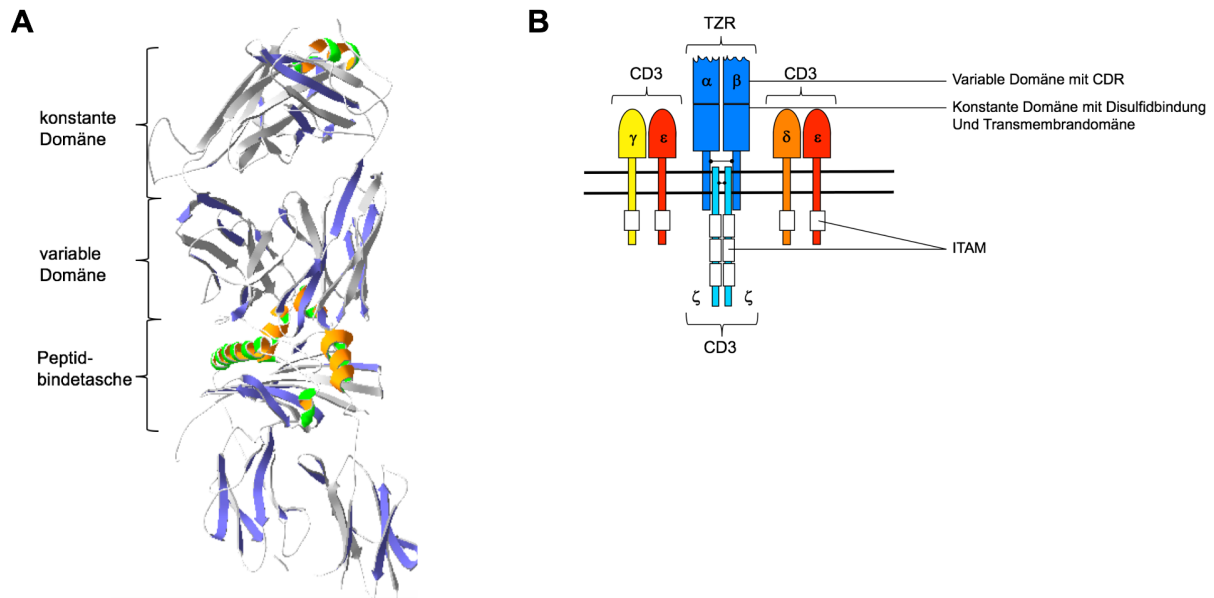


Abbildung 3: **Struktur des TZR**

(A) Tertiärstruktur von TZR 2IAM (77), in der mit Hilfe des Pdb-Viewers von SWISS-MODEL (78) die Sekundärstruktur sichtbar gemacht wurde. Der oben dargestellte TZR bindet das unten dargestellte HLA-DR, wobei die jeweiligen Domänen beschriftet wurden. (B) Schematische Darstellung eines TZR  $\alpha$ : $\beta$ -Heterodimers mit CD3 nach Murphy, Weaver 2017 (79). Das CD3 ist mit den Heterodimeren CD3 $\delta\epsilon$  und CD3 $\gamma\epsilon$ , sowie mit dem Homodimer CD3 $\zeta\zeta$ , die jeweils die zur Signaltransduktion notwendigen ITAM tragen, abgebildet.

Die variablen Domänen kodieren jeweils für 3 sogenannte CDR (*complementary determining regions*). CDR1 und CDR2 vermitteln den Kontakt zu konservierten Domänen von HLA (55,80) und leiten sich vom Keimbahngenom ab (81). CDR3, dessen Sequenz stark durch genetische Rearrangements verändert wird (81), ist vornehmlich für die Bindung des Peptids verantwortlich (82). Um ein möglichst großes Spektrum an Peptiden binden zu können, kommt es während der Entwicklung der T-Zellen zu einem genetischen Rearrangement von Variable-, Joining- und Diversity (VDJ)-Regionen der TZR-Loci (81,83). Durch die anschließende Selektion der unreifen T-Lymphozyten im Thymus wird die sogenannte zentrale Toleranz ausgebildet (73). Im Rahmen der Positivselektion werden T-Lymphozyten eliminiert, die kein HLA binden können. Die Negativselektion sortiert Lymphozyten aus, die autologe Peptide hochaffin binden (84) (Abb. 4). Ob die T-Zelle CD4 oder CD8 als Korezeptor exprimiert, entscheidet die Spezifität des TZR gegenüber HLA Klasse I oder HLA Klasse II während der Positivselektion (85). Vereinfacht entstehen T-Lymphozyten, die an autologes HLA

## Einleitung

binden können aber lediglich Peptide erkennen, die nicht von autologen Proteinen abgeleitet werden.

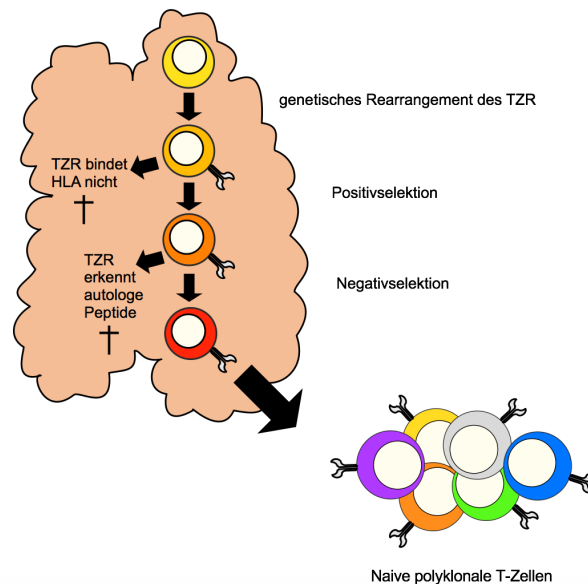


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Selektion von T-Lymphozyten im Thymus

Nach dem genetischen Rearrangement durchlaufen die T-Zellen die Positiv- sowie die Negativselektion, wobei nicht geeignete T-Lymphozyten entfernt werden. Es entstehen polyklonale, naive T-Zellen.

Der TZR erkennt die Oberflächenstruktur aus HLA und beladenem Peptid auf komplexe Art und Weise. Die Wechselwirkung von TZR und HLA kann als Modell in zwei Schritte aufgeteilt werden (86). Im ersten Schritt kommt es zur Bindung des TZR an das Gerüst des erkannten HLA (86). Der TZR bindet hierbei in einem recht stereotypen, schrägen Bindungswinkel mit konservierter Polarität von  $V_\alpha$  und  $V_\beta$  (55,80,87). CDR1 und CDR2 kommen typischerweise über den Helices zum Liegen. Hierdurch wird CDR3 im Zentrum der Kontaktfläche, zum Peptid gewandt, positioniert (87). In der zweiten Phase wird das Peptid durch die flexiblere CDR3 mit Hilfe von *induced fit* gebunden (86). Insgesamt wird die Bindung des TZR nicht allein durch die Wechselwirkung von Peptid und CDR3 erreicht. Vielmehr kommt es durch die Interaktion von Peptid, HLA und TZR zu einer spezifischen Bindung (87). TZR können im Sinne dieses Mechanismus viele HLA absuchen, bis sie ihr spezifisch erkanntes Peptid binden und dabei eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen Peptiden aufweisen (86).

Zusätzlich zum TZR binden auch die jeweiligen Korezeptoren CD4 und CD8 an das HLA. Dadurch wird die intrazelluläre Signalkaskade nach der Bindung zwischen TZR und HLA verstärkt (88). Nur unter speziellen experimentellen Bedingungen konnten korezeptorunabhängige Rezeptoren generiert werden, die in ihren Bindungseigenschaften Antikörpern ähnlich waren (89).

## Einleitung

T-Zellen binden nicht nur an das peptidbeladene HLA auf den antigenpräsentierenden Zellen, sondern bilden eine immunologische Synapse während ihrer Interaktion. Diese besteht aus dem TZR-HLA Komplex, kostimulatorischen Domänen mit Liganden sowie Integrinen und Integrinliganden. Nach dem initialen Kontakt der T-Zelle mit dem spezifisch erkannten Antigen kommt es nicht nur zu einer Umstrukturierung der Kontaktfläche zwischen T-Zelle und antigenpräsentierenden Zelle, sondern auch zu einer Polarisierung und zu strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts, was sekretorische Vesikel und Mitochondrien in Richtung Zell-Zell Kontakt bringt. Insgesamt ermöglicht die immunologische Synapse eine effektive Signaltransduktion (90,91).

Das vom TZR gebundene HLA kann in zwei Klassen aufgeteilt werden. HLA-Klasse I, das von jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert wird, wird von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebunden. Die Expressionsdichte dieses HLA variiert je nach Zelltyp und dient der Identifikation der Körperzelle als körpereigen (92). Es sind viele Allelvarianten der auf Chromosom 6 liegenden HLA Moleküle bekannt, wobei die Ausstattung des Individuums mit bestimmten HLA-Molekülen als Haplotyp bezeichnet wird. Die polymorphen HLA-A, -B, -C werden von fast jeder kernhaltigen Zelle exprimiert, während weitere HLA-Klasse I-Subtypen unterschieden werden können, die hinsichtlich ihrer Gewebeexpression deutlich restringierter sind (92,93).

Die Struktur der HLA-Klasse I besteht aus einem Anteil mit Transmembrandomäne ( $\alpha_3$ ) und zwei Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ), die die Peptidbindetasche bilden. Zusätzlich dazu ist das  $\beta_2$ -Mikroglobulin assoziiert, das auf Höhe der  $\alpha_3$ -Untereinheit liegt (92,94). Die Peptide, die auf das HLA-Klasse I geladen werden, stammen aus dem Zytoplasma. Dort werden fehlgefaltete und degradierte Proteine mit Hilfe des Proteasoms zu Peptiden abgebaut und von TAP (*transporter associated with antigen processing*) als Transportkanal für die zytoplasmatischen Peptide in das endoplasmatische Retikulum transloziert. Hier werden die Peptide durch Helferproteine auf das HLA-Klasse I geladen (95) (Abb. 5). Im Rahmen der Kreuzpräsentation kann es vorkommen, dass zusätzlich auch Peptide aus endozytierten Pathogenen auf das HLA geladen werden (96). In beiden Fällen besitzen die präsentierten Peptide eine Länge von ungefähr 8-13 Aminosäuren, die vor allem im Bereich des C- und N-Terminus verankert werden (97).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen mit ihrem TZR HLA-Klasse II. Die Expression dieser HLA ist vornehmlich auf B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen beschränkt, die als

## Einleitung

Aktivatoren und Effektoren an der Immunantwort beteiligt sind (professionell antigen-präsentierende Zellen (APC)). Sie dienen der Präsentation von Peptiden exogen aufgenommener Proteine (98). Die HLA-Klasse II liegt als Heterodimer auf der Zelloberfläche vor, wobei  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit aus jeweils zwei Domänen bestehen. Die Transmembrandomänen befindet sich jeweils zellnah und besitzen einen kleinen zytoplasmatischen Schwanz. Die Peptidbindetasche wird sowohl von der  $\alpha$ - als auch von der  $\beta$ -Untereinheit gebildet und besteht aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur am Boden der Peptidbindetasche, die von zwei antiparallelen Helices umgeben wird (97,99,100). Im Gegensatz zu HLA-Klasse I ist die Bindetasche, mit der die Peptide interagieren, in ihrer Länge nicht begrenzt, sodass unterschiedlich lange Peptide mit ungefähr 12-20 Aminosäuren binden können (97). Dabei spielen Ankerdomänen der Peptide eine wichtige Rolle, die entlang der gebundenen Peptide immer gleich sind und als Hauptbindungsagonisten fungieren (97).

HLA-Klasse II wird über einen spezialisierten Beladungsweg mit Peptiden beladen, die von phagozytierten Proteinen und Pathogenen abstammen. Direkt nach der Synthese und der Dimerisierung der HLA im endoplasmatischen Retikulum wird eine stabilisierende Struktur, die sogenannte *invariant chain* (Ii), an die Peptidbindetasche gebunden. Diese dient einerseits als Chaperon des neu synthetisierten HLA Klasse II, andererseits wird durch die Bindung auch die weitere Prozessierung eingeleitet (101). Das neu synthetisierte HLA wird aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat transportiert. Dort finden vor dem Transport in das *HLA-class II compartment* (MIIC, Teil des endosomalen Kompartiments) (102,103) weitere posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, statt (104). Sie verändern die Bindungsgeometrie von TZR an HLA (104), verändern die Oberflächenstruktur der HLA (105), modulieren die funktionellen Eigenschaften des HLA je nach Zellkontext (104) und beeinflussen die Zugänglichkeit zum Peptid (103). Während des Transports des HLA-Klasse II/Ii Komplexes zu den MIIC bauen Cathepsine die Ii ab, sodass nur noch ein Rest, das sog. CLIP (*class II associated invariant chain peptide*) als Platzhalterpeptid in der Bindetasche verbleibt (98,102,106,107). Im nächsten Schritt wird CLIP über die Bindung von HLA-DM an den HLA-Klasse II Komplex extrahiert und das HLA erst dann wieder durch HLA-DM freigegeben, wenn ein hochaffin bindendes Peptid in der Bindetasche zu liegen kommt (106,108,109). HLA-Klasse II befindet sich im Komplex mit HLA-DM in einem thermodynamischen Übergangszustand bis zur Bindung des hoch-



## Einleitung

T-Lymphozyten angesehen werden kann (113). Den Eintritt in die lymphatischen Organe ermöglichen spezifische Liganden (114). Dort treffen die Lymphozyten unter anderem auf dendritische Zellen. Deren Hauptaufgabe besteht darin, Pathogene aufzunehmen, zu prozessieren und diese auf ihrer Oberfläche in peptidbeladenen HLA zu präsentieren (115). Sie befinden sich dabei in fast allen Körpergeweben (68,116). Nach dem Kontakt mit Pathogenen reifen dendritische Zellen zu APC aus und wandern anschließend in die lymphatischen Gewebe (115). Während der Reifung werden HLA-Klasse II, kostimulatorische Proteine und Zelladhäsionsproteine exprimiert, was eine effektive Präsentation der Pathogenstrukturen und Aktivierung von T-Zellen ermöglicht (115,116). Beispielsweise binden die für eine effektive Signaltransduktion notwendigen CD80/86 an CD28 auf der T-Zelle. Nur nach dieser Bindung kann eine effektive Antigenerkennung stattfinden, ohne die Bindung geht die T-Zelle entweder in Apoptose oder wird anerg (67). Dieser Mechanismus ist als periphere Toleranz bekannt (117). Nach der Erkennung ihres spezifisch erkannten Antigens stoppen die Lymphozyten die Migration und beginnen eine klonale Expansion (118). Durch Zellteilung entstehen viele Effektorzellen und Gedächtnis-T-Zellen, die bei einem erneuten Antigenkontakt die spezifische Immunantwort einleiten (67,119) (Abb. 6).

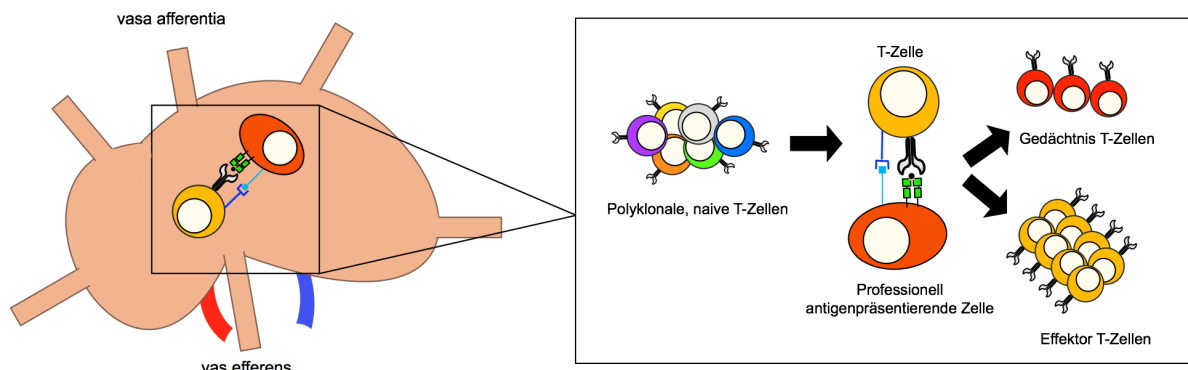


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der im Lymphknoten stattfindenden T-Zell Reifung**

Die T-Zell Reifung ist schematisch dargestellt. Die aus dem Thymus entlassenen T-Zellen flottieren an professionell antigenpräsentierenden Zellen, z.B. dendritischen Zellen, vorbei, die neben dem entsprechenden peptidbeladenen HLA zusätzlich noch kostimulatorische Domänen exprimieren. Erhält eine spezifische T-Zelle Kontakt mit ihrem Antigen, so kommt es zu einer Proliferation und Entstehung von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen (67).

Nach dieser Expansionsphase verlassen die Lymphozyten das lymphatische Organ in die Blutbahn und gelangen zum Ort der Infektion. Chemokine und Integrine auf den Endothelien führen die T-Zellen zum Ort der Inflammation, an dem sie über die Diapedese das Gefäßsystem verlassen (120).

### 2.7 Donor lymphocyte infusion (DLI) und adoptive T-Zell Therapie

Aufgrund der wichtigen Rollen des durch die T-Lymphozyten ausgelösten GvL-Effektes nach der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (121), werden Strategien gesucht, diesen Effekt gezielt auszunutzen.

Ein möglicher Ansatz, der seit vielen Jahren intensiv erforscht wird, ist die *Donor lymphocyte infusion* (DLI). Bei dieser Methode werden unselektierte T-Lymphozyten des Stammzellspenders in den Patienten transfundiert, um einen GvL-Effekt zu induzieren (122–124). Die Nebenwirkungen der DLI umfassen im Wesentlichen die Induktion einer GvHD und mit geringerer Inzidenz die Induktion eines aplastischen Syndroms (123,125,126). Zudem zeigte sich, dass die DLI in der Therapie eines Krankheitsrückfalles der AML keinen Vorteil bietet (126,127). Das wird u.a. auf die geringe Menge kostimulatorischer Proteine auf den Blasten, die Induktion aneurer T-Zellen bei dauerhafter Antigenpräsentation ohne kostimulatorische Moleküle und den Rückzug maligner Zellen in immunologisch privilegierte Gewebe zurückgeführt (125,127). Lediglich für bestimmte Patientengruppen mit Hochrisiko-AML nach T-Zell depletierter allogener Stammzelltransplantation ohne Komplikationen, bei der eine deutliche Latenz zwischen Transplantation und DLI vorlag, konnte ein positiver Effekt nachgewiesen werden (128).

Wegen der fehlenden Spezifität und Effektivität sind weitere Maßnahmen erforderlich, den GvL-Effekt bei möglichst kleinem Risiko für eine GvHD zu fördern. Die T-Lymphozyten richten sich im Rahmen der GvL-Reaktion nicht nur gegen *minor histocompatibility antigens* (mHAg) und allogenes HLA, sondern auch gegen nicht polymorphe, tumorspezifische Antigene. Die Leukämieblasten exprimieren verschiedene tumorassoziierte, tumorspezifische und sogenannte Hoden/Tumor Antigene (129).

Daher wurde in einer klinischen Studie die Impfung gegen die leukämiespezifische Zielstruktur Wilms-Tumorantigen-1; WT1 durchgeführt. Trotz einer *in vitro* nachgewiesenen T-Zell Antwort konnte keine klinische Effektivität gemessen werden (63). Erfolge wurden unter anderem erzielt, wenn dem Patienten bestrahlte Leukämieblasten und Fibroblasten, auf deren Oberfläche kostimulatorische Proteine überexprimiert wurden, als Impfung verabreicht wurden (63). Aktuell erscheint bei diesem Ansatz die Fusion von autologen dendritischen Zellen und AML-Blasten aussichtsreich zu sein (130).

Der adoptive Transfer leukämiespezifischer Lymphozyten ist ein weiterer Ansatz. Dabei werden gegen Leukämieantigene gerichtete T-Zellen *in vitro* expandiert und dem

## Einleitung

Patienten verabreicht. Allerdings tragen die T-Zellen oftmals niedrig affine T-Zell Rezeptoren und die individuelle Immunantwort gegen diese Zielstrukturen ist sehr heterogen (122). Außerdem differenzieren die T-Lymphozyten während der Stimulation, sodass sowohl die Effektivität zur Zerstörung der Leukämieblasten, als auch das Erreichen der Lymphknoten und die Lebensdauer sinken (131). Die für die Herstellung solcher T-Zellen notwendige Zellkultur ist zudem zeit- und kostenintensiv (132).

Die Therapie mit genetisch veränderten T-Zellen ist die derzeit aussichtsreichste Strategiealternative. Dabei werden T-Zellen entwickelt, die neben den polyklonalen endogenen T-Zell Rezeptoren auch eingebrachte antigenerkennende T-Zell Rezeptoren oder genetisch modifizierte, rezeptorähnliche Proteine (chimäre Antigenrezeptoren) tragen (122).

Werden TZR in die T-Lymphozyten eingebracht, erfolgt die Erkennung der Zielstruktur HLA-abhängig. Mögliche Zielstrukturen können Peptide von in Leukämieblasten überexprimierten Proteinen wie WT1 (Wilms-Tumor-1 Protein), PR-3 (Proteinase-3), HMMR/Rhamm (hyaluronan mediated motility receptor) und Survivin (122,133) darstellen. Allerdings werden die entsprechenden T-Zell-Epitope nicht immer ausreichend prozessiert und von den Leukämieblasten präsentiert (134), sodass die Suche nach effektiven Zielstrukturen schwierig ist. Arbeiten zur rezeptorbasierten adoptiven T-Zell Therapie für die AML haben bislang einen HLA-A2 spezifischen TZR bis zur Anwendung in klinischen Studien gebracht, der ein HLA-A\*02:01 restringiertes Peptidepitop von WT1 erkennt (66,129,135,136). Andere TZR basierte adoptive T-Zell Therapien, etwa gegen das tumorspezifische Antigen Survivin (137), befinden sich in der Entwicklung.

Aktuell basiert die adoptive T-Zell Therapie der akuten myeloischen Leukämie mit reprogrammierten T-Zellen vornehmlich auf sogenannten *chimeric antigen receptors* (CAR), die aus drei Untereinheiten bestehen. Extrazellulär befindet sich ein antigenerkennendes Protein, das der antigenbindenden Struktur eines Antikörpers gleicht. Unter einer Platzhalterstruktur befindet sich die Transmembrandomäne, an der sich wiederum die Signaldomäne eines TZR oder anderer kostimulatorischer Rezeptoren befindet (138). Die Zielstrukturen der CAR sind HLA-unabhängige Oberflächenantigene (129). Im Fokus stehen hierbei vor allem die Blastenantigene CD33, CD34, CD38, CD44v6, CD123 und LeY (138–141). Allerdings ist ihre Expression meist nicht streng auf die Leukämieblasten restringiert. Daher können Nebenwirkungen der Therapie,

## Einleitung

wie etwa die Schädigung von Lebergewebe, Haut oder gesunden Zellen des hämatopoetischen Systems, entstehen (139,142,143).

Nebenwirkungen gentechnisch veränderter adoptiver T-Zellen werden in sogenannte *on-target* und *off-target* Effekte eingeteilt (144). *On-target off-tumor* Effekte beschreiben eine Erkennung der Zielstruktur auf gesunden Zellen, die dieses ebenfalls exprimieren (145). Ein Beispiel eines *on-target off tumor* Effekts ist die Lungenschädigung durch einen gegen Her2-gerichteten CAR, da Her2 nicht nur vom Tumor, sondern auch von Zellen in der Lunge exprimiert wird (145). *Off-target* Effekte beschreiben die Schädigung von Zellen, die das spezifisch erkannte Antigen nicht exprimieren (144). Diese können auf der Kreuzreaktivität des Rezeptors mit anderen Epitopen oder auf der Neoaktivität von Fehlpaarungen der eingebrachten Rezeptorketten mit endogenen Ketten basieren (145). Ein Beispiel für die Kreuzreaktivität ist der *off-target* Effekt eines gegen HLA-A2 mit MAGE-A3 gerichteten TZR gegen kardiales Titin, das ein dem Tumorpeptid ähnliches Motiv aufweist (146). Auch die organschädigende Wirkung der massenhaften Zytokinfreisetzung wird von manchem Autor zu den *off-target*-Effekten gerechnet (144).

## 2.8 HLA-DP Antigene

Das HLA-Klasse II Antigen HLA-DP wird bislang bei der Spenderauswahl zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation nicht berücksichtigt, so dass hier aufgrund eines starken Verteilungsungleichgewichtes zwischen HLA-DP und HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in ca. 80% der unverwandten Spender-/Empfängerpaare ein Mismatch vorliegt (2). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene HLA-DP Fehlpaarungs-Konstellationen unterschiedliche Auswirkungen auf das GvHD-Risiko sowie das Leukämierisidiv-Risiko haben (147,148).

Je nach Immunogenität werden HLA-DP Konstellationen zwischen Spender- und Empfänger besser (sog. permissive Mismatches) bzw. schlechter (sog. nicht-permissive Mismatches) toleriert, da letztere das Risiko für eine GvHD erhöhen (147,148). Die Immunogenität selbst beruht auf Effekten der Selektion von T-Zellen im Thymus, die jeweils bei Spender und Empfänger physiologisch stattfinden und sich für verschiedene Allele unterscheiden (147,148). Interessanterweise sind sowohl die permissiven als auch die nicht-permissiven Mismatch-Konstellationen im Vergleich zu HLA-DP

## Einleitung

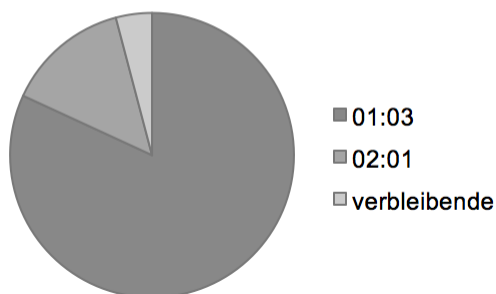
identischen Patienten/-innen/ Spender-Paaren mit einer geringen Inzidenz für Leukämierезidiv assoziiert (3–5), was HLA-DP Antigene als Zielstruktur für eine Graft-versus-Leukämie-Reaktivität vermuten lässt (149,150).

### 2.9 HLA-DP als Zielstruktur des *Graft versus Leukemia* Effekt

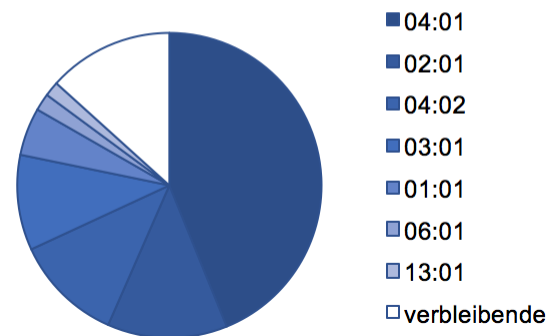
Im Gegensatz zu HLA-Klasse I Antigenen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, werden HLA-Klasse II nur auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs konstitutiv exprimiert. Eine Expression von HLA-Klasse II auf nicht-hämatopoetischen Zellen findet sich dagegen nur in Situationen der Inflammation, in denen proinflammatorische Zytokine die HLA-Klasse II Expression induzieren können (68). Das ermöglicht einen selektiveren GvL-Effekt durch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Das HLA-DP weist zusätzlich einen sehr geringen Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung auf (151) (Abb. 7), was im Rahmen einer adoptiven HLA-DP gerichteten T-Zell Therapie die Abdeckung einer großen Zahl an Patienten/-innen ermöglichen würde.

#### **A** HLA-DPA1 Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung



#### **B** HLA-DPB1 Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung



### C Verteilung der HLA-DPA1/-DPB1 Kettenpaarungen in der kaukasischen Bevölkerung

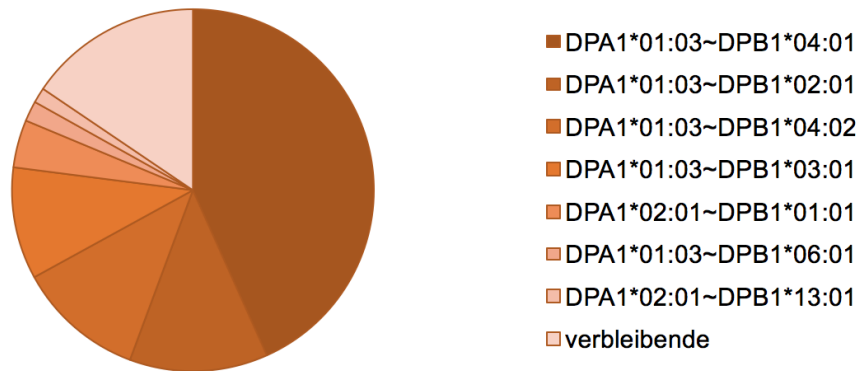


Abbildung 7: Allelfrequenz der HLA-DP in der kaukasischen Bevölkerung

Frequenz einzelner (A) HLA-DPA1-, (B) HLA-DPB1-Allele und (C) HLA-DPA1/-DPB1 Kombinationen in der kaukasischen Bevölkerung nach Hollenbach et al. (151).

In einer Untersuchung von Rutten et al. wurden während des klinischen Erfolgs einer DLI nach HLA-DP disparater hämatopoetischer Stammzelltransplantation T-Lymphozyten isoliert. Diese wurden anschließend auf ihre Reaktivität geprüft, wobei sich eine polyklonale T-Zell Reaktivität gegen HLA-DP *in vitro* nachweisen ließ (152). Petersdorf et al. konnten außerdem zeigen, dass sich die Rückfallrate der zu Grunde liegenden hämatologischen Erkrankung erhöht, wenn eine niedrigere Expression von HLA-DP in den Blasten vorliegt (1). HLA-DP scheint somit ein wichtiges Antigen des GvL-Effektes darzustellen.

## 2.10 Herstellung von HLA-DP spezifischen T-Zellen

Aufgrund der beschriebenen Funktion von HLA-DP als GvL Zielantigen und dessen Expression auf Leukämieblasten der AML, wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe HLA-DP spezifische T-Zellen generiert. Dies erfolgte durch Stimulation von naiven CD45RA selektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines gesunden Spenders mit primären Leukämieblasten eines HLA-Klasse I sowie HLA-DR und DQ gematchten Patienten/-innen, wobei für HLA-DP eine Mismatch-Konstellation vorlag (7) und die AML-Blasten das allogene HLA-DPB1\*04:01 Allel exprimierten. Nach mehrwöchiger T-Zell-Stimulation bzw. Restimulation konnten in sogenannten Mikrokulturen HLA-DPB1\*04:01 reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klone generiert werden, die in funktionellen Tests spezifisch HLA-DPB1\*04:01 positive Leukämiezellen unterschiedlicher Patienten/-innen erkannten.

## Einleitung

Ein CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klon (Klon 11C12), der auf diese Weise generiert werden konnte, war auch nach Blockade des CD4<sup>+</sup> Korezeptors noch in der Lage, HLA-DPB1\*04:01 positive Zielzellen zu erkennen, so dass hier von einer hohen Affinität des T-Zell Rezeptors (TZR) ausgegangen werden muss. Um die Herstellung solcher HLA-DP reaktiver T-Zellen zu vereinfachen, wurde im nächsten Schritt der TZR, welcher zur Subfamilie V $\beta$ 13.2 gehört, aus dem T-Zell-Klon 11C12 isoliert, um anschließend in T-Zellen gesunder Spender eingebracht. Der TZR Transfer erfolgte mittels Elektroporation von T-Zellen mit in-vitro-transkribierter RNA, welche für den TZR kodiert und eine rasche Translation und Expression des TZR in T-Zellen erlaubt. Zur Stabilisierung und Verbesserung der TZR-Expression wurde der Rezeptor in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe kodonoptimiert. Das bedeutet dass die Sequenzen des Rezeptors an die Basenabfolgen im Empfängerorganismus angepasst werden, ohne dabei die Aminosäuresequenzen zu verändern (153,154).

## 2.11 Charakterisierung des HLA-DP spezifischen T-Zell Rezeptors

### TZR<sub>11C12</sub>

Das Projekt knüpft nach der Isolation des TZR<sub>11C12</sub> aus dem HLA-DPB1\*04:01 reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klon 11C12 an, indem es die Bindungsspezifität des TZR näher charakterisiert, um ihn für die adoptive T-Zell Therapie weiterzuentwickeln. Dazu sollte zunächst die Kreuzreaktivität gegenüber häufig vorkommenden HLA-DPA1/-DPB1 Allelen getestet werden. Um die Fragestellung zu klären, ob ein bestimmtes HLA-DPB1\*04:01 restringiertes Peptid spezifisch vom TZR erkannt wird bzw. die Erkennung „Peptid-unabhängig“ erfolgt, wurde das HLA-DPB1\*04:01 in einem breiten Spektrum an hämatopoetischen, nicht-hämatopoetischen sowie xenogenen Zellen exprimiert und auf Erkennung durch den TZR getestet. Die Expression von HLA-DPB1\*04:01 in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Zelllinien erlaubte eine Beladung des eingebrachten HLA-DP mit einer Vielzahl unterschiedlicher bzw. xenogener Peptide. Zur Feststellung, ob lediglich die HLA-DPB1 Kette oder der Komplex aus HLA-DPA1 und HLA-DPB1 durch TZR<sub>11C12</sub> erkannt wird, wurden verschiedene Kombinationen beider Allele exprimiert und ebenfalls auf Reaktivität getestet. Um das Potenzial des Rezeptors hinsichtlich der Induktion einer GvHD zu testen, wurden außerdem GvHD-Modellzelllinien auf ihre Erkennung geprüft.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialliste

#### 3.1.1 Laborgeräte

Abzug Typ TAN 120	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel, AT
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Typ 75S	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
BD FACS Calibur	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Computer Power Mac G4	Apple, Cupertino, US
C.T.L. ELISpot Reader	C.T.L., Shaker Heights, US
Einfrierbox cryo safe	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Eismaschine AF 20	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, US
Gefrierschrank Forma 900 Series	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Gene Pulsar Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Heizblock Thermo Top®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Inkubationsschrank Heracell 240i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
MACS MultiStand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
Magnetrührer HR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
Milli-Q Q-Pod® Reinstwasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, Billerica, US
Mini Laboratory Pump VP86	VWR International, Radnor, US
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
PCR-Gerät Mastercycler® Nexus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Pipetboy 2	Integra Biosciences AG, Hudson, US
Pipette Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Multichannel	Starlab GmbH, Hamburg, DE
Präzisionswaage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Mikroskop PrimoVert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Schüttelgerät 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Spannungsquelle EV231	Consort bvba, Turnhout, BE
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Stickstofftank HEco Series 800-190	Chart MVE BioMedical, San Antonio, US
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Typhoon 9200	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Vortex VV3	VWR International, Radnor, US

## Material und Methoden

Wärmebad Typ 1003

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel,  
DE

Wärmekammer H1.2, SO01.BR

Kälte Schübl, Regensburg, DE

Zählkammer Neubauer improved bright-line  
depth 0,1mm

Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, DE

Zentrifuge 5424 R

Eppendorf AG, Hamburg, DE

### 3.1.2 Verbrauchsgüter

#### Plastikwaren

Abdeckplatte PS, Hohes Profil 9mm

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Cellstar Polypropylen Röhrchen 15ml und 50ml

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Cryo.s™ 2ml

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Elektroporationsküvetten 4mm

PEQLAB by VWR International

GmbH, Erlangen, DE

FACS-Tubes

Becton Dickinson, Franklin Lakes, US

MACS PreSeparation Filter

Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE

MACS Separation Columns LS

Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE

MultiScreen Filter Plates

Merck Millipore, Billerica, US

MultiScreen HTS Filter Plates

Merck Millipore, Billerica, US

Multiwellplatten 6 well, 12 well, 24 well

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Nitrilhandschuhe

Kimberly-Clark, Irving, US

Parafilm (M)®

Bemis Company Inc., Neenah, US

Petrischalen P10

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Pipette ErgoOne 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl

Starlab GmbH, Hamburg, DE

Pipettenspitzen graduiert 10µl, 200µl, 1000µl

Starlab GmbH, Hamburg, DE

Pre-Separation Filters (30µm)

Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE

Safe Lock Tubes 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml biopur

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Safe Seal Tips Professional 10 µl, steril

Biozym, Hessisch-Oldendorf, DE

Serologische Pipetten 5ml, 10ml 25ml, 50ml

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Sterican Kanülen 0,4\*25 mm 27G\*1,5LL

B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Sterican-Kanülen 0,4\*25 mm 27G\*1LL

B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Tip One Filter Tip 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl

Starlab GmbH, Hamburg, DE

Versa Touch Handschuhe

Ansell, Richmond, VIC, AUS

Zellkulturflasche T25, T75 und T125

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Zellkulturplatten 48 well, 96 well Rundboden und  
96 well Spitzboden

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

Zellkulturschale P10 und P15

Greiner bio one GmbH, Kremsmünster, AT

## Material und Methoden

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
3-Amino-9-ethyl-carbazol	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ampuwa® Spüllösung Plastipur®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
BSA	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Chlorophorm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
CutSmart®	New England Biolabs, Ipswich, US
Dimethylsulfoxid (DMSO), BioScience-Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Phenol/ Chlorophorm/ Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Plasmocin®	InvivoGen, San Diego, US
Plasmocure®	InvivoGen, San Diego, US
EDTA	Applichem, Darmstadt, DE
Essigsäure	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Ethanol >99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
FACS Clean Solution	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
FACS Rinse	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Formaldehyd	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Gel Loading Dye	New England Biolabs, Ipswich, US
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ligase Buffer	New England Biolabs, Ipswich, US
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Natriumacetat	Ambion® by Life Technologies, Carlsbad, US
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pancoll Human Density	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, DE
RNase Zap™	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
RotiSafe	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Trypan blue 0,5% in physiological saline	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Trypton/ Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tween 20	Applichem, Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Xylencyanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

## Material und Methoden

### 3.1.4 Antikörper

anti CLIP PE (S)	REA296	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
anti mouse CD11c-FITC	HL3	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Anti-human-Interferon- $\gamma$ mAb 1-D1K		Mabtech AB, Stockholm, SE
Anti-human-Interferon- $\gamma$ mAb 7-B6-1-Biotin		Mabtech AB, Stockholm, SE
B7/21 anti-DP (B7/21)	B7/21	Leinco Technologies, Inc., St. Louis, US
CD4 APC	RPA-T4	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
CD4 MicroBeads		Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
F <sub>c</sub> R-Block		Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
gam-FITC (polyklonal)		Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Hb55 anti-DR (Hb55)	Hb55	Zellkulturüberstand Universität Mainz
Isotyp IgG <sub>3</sub>		eBioscience, San Diego, US
REA-Control PE (S)	REA296	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, DE
SpVL6 anti-DQ (SpVL6)	SpVL6	Zellkulturüberstand Universität Mainz
V $\beta$ 13.2 PE	H132	Beckman Coulter, Brea, US
V $\beta$ 13.6 PE	JU74.3	Beckman Coulter, Brea, US

### 3.1.5 Kits

High Pure PCR Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, US
Dynabeads Human T-Activator CD3/28	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN N.V., Venlo, NL
QIAPrep Spin Miniprep Kit	QIAGEN N.V., Venlo, NL
QIAGEN RNEasy Mini Kit	QIAGEN N.V., Venlo, NL
QIAshredder	QIAGEN N.V., Venlo, NL
SuperScript II OneStep RT-PCR System	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US

### 3.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

AIM-V Medium	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
DMEM	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
F-12K Medium	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, DE
L-Glutamin	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Hepes Buffer (1M)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, US
Humanes Serum (HS)	Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, München, DE
MEM	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Murines GM-CSF	Zellkulturüberstand des Lehrstuhls für Immunologie, Universitätsklinikum Regensburg

## Material und Methoden

OptiMem	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Penicillin/Streptomycin	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Schneider-Medium	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Trypsin 0,05% - EDTA 1x	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US

### 3.1.7 Zellkulturmedien

#### Medium zur Kultivierung von Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurde das Zellmedium nach den Datenbanken des DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) oder ATCC (American Type Culture Collection) ausgewählt und, wenn nicht anders angegeben, mit 30mmol/l HEPES-Puffer, 120 IU/ml Penicillin und 0,12 mg/ml Streptomycin versetzt. Die Zuordnung der Zelllinien zu den einzelnen Medien findet sich in Kapitel 3.3.2.

#### Medium zur Kryokonservierung von Zellen

Fetales Kälberserum  
+ 10% DMSO

#### LB-Medium (flüssig) zur Kultivierung von Bakterien

900 ml destilliertes Wasser  
+ 10 g Trypton  
+ 5 g Hefeextrakt  
+ 10 g NaCl  
Anschließend auf pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert

#### SOB-Medium

900 ml destilliertes Wasser,  
+ 20 g Trypton  
+ 5 g Hefeextrakt  
+ 0,5 g NaCl  
+ 2,5 ml 1M KCl  
Anschließend auf pH= 7,0 eingestellt und autoklaviert

## Material und Methoden

### Agar-Platten

Alle verwendeten Agar-Platten wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Regensburg bezogen.

### 3.1.8 Puffer und Lösungen

#### TBE-Puffer (10x)

500 ml destilliertes Wasser

+ 54 g TRIS

+ 27,5 g Borsäure

+ 20 ml 0,5M EDTA

#### MACS-Puffer

500 ml PBS

+ 0,5% BSA

+ 2mM EDTA

#### FACS-Fixans

PBS + 1% Formaldehyd

### 3.1.9 Zytokine

rh-IL-2

Novartis AG, Basel, CH

rh-IL-7

R&D Systems, Inc., Minneapolis, US

rh-IL-15

PeproTech, Rocky Hill, US

rh-IFN- $\gamma$

eBioscience, San Diego, US

### 3.1.10 Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel Purasept<sup>®</sup>-A Xpress

Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, DE

Desinfektionstücher Desco Wipes

Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, DE

Händedesinfektionslösung Manisoft<sup>®</sup>

Ecolab<sup>®</sup> Inc., St. Paul, US

Händedesinfektionslösung Mucasept-A<sup>®</sup>

Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, DE

Incidin<sup>®</sup> Plus

Ecolab<sup>®</sup> Inc., St. Paul, US

### 3.1.11 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)

New England Biolabs, Ipswich, US

Spel

New England Biolabs, Ipswich, US

T4 DNA Ligase

New England Biolabs, Ipswich, US

## Material und Methoden

Xbal

New England Biolabs, Ipswich, US

Xhol

New England Biolabs, Ipswich, US

### 3.1.12 Nucleotide und Oligonukleotide

2log DNA Ladder

New England Biolabs, Ipswich, US

5'-ATACCGCTCGAG-

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE

TTATGCAGATCCTCGTTG

-3' (HLA-DPB1 reverse Primer)

5'-CGCTAGTCTAGAACCATGATGGTT-

CTGCAG

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE

-3' (HLA-DPB1 forward Primer)

Deoxynucleotide Solution Mix

New England Biolabs, Ipswich, US

Oligo(dT) Primer

Thermo Fischer Scientific, Waltham, US

### 3.1.13 Peptide

KKLLTQHFVQENYLEY (MAGE-A3<sub>243-258</sub>)

JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, DE

RKVAELVHFLLLYR (Tetanustoxoid<sub>111-125</sub>)

JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, DE

### 3.1.14 Tetramere

Tetramer HLA-DPA1\*01:03 + HLA-DPB1\*04:01 +  
Peptid KKLLTQHFVQENYLEY (MAGE-A3<sub>243-258</sub>)

Lausanne Tetramer core facility of the Ludwig In-  
stitute for Cancer Research

Tetramer HLA-DPA1\*01:03 + HLA-DPB1\*04:01 +  
Peptid RKVAELVHFLLLYR (Tetanustoxoid<sub>111-</sub>

Lausanne Tetramer core facility of the Ludwig In-  
stitute for Cancer Research

125)

### 3.1.15 Vektoren

pGEM4Z-64A

Cell Biolabs Inc., San Diego, US

### 3.1.16 Software

CellQuest Pro

BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE

CloneManager 9

Scientific and Educational Software, Morrisville,  
US

FlowJo v10.1

FlowJo LLC, Ashland, US

GraphPad Prism Version 7

GraphPad Software Inc., San Diego, US

ImmunoSpot

C.T.L., Shaker Heights, US

ImmunoCapture

C.T.L., Shaker Heights, US

Pdb-Viewer von SWISS-MODEL(78)

Protein Structure Informatics Group, Basel, CH

### 3.2 Klonierung der HLA-DP Ketten

#### 3.2.1 Ficoll-Dichtezentrifugation

Die Isolation notwendiger HLA-DP Allele erfolgte aus bereits aufgereinigten PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) gesunder Thrombozytenspender der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg. Als Ausgangsmaterial für die Isolation der Zellen dienten die nach der Zellseparation und Thrombozytenentnahme übrig gebliebenen Zellen der Spender. Aus diesen wurden die PBMC mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst eluiert und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 60 ml verdünnt. Je 30 ml dieser Suspension wurden anschließend auf 15 ml vorgelegte Lösung des Zuckerpolymers Pancoll aufgetragen. Dieser sorgte in einer anschließenden Zentrifugation mit 2200 rpm für 20 Minuten dafür, dass die Leukozyten aufgrund ihrer Größe auf der Polymerschicht verblieben, während die Erythrozyten durch das Polymer auf den Boden des Probengefäßes sanken. Um den Gradienten zu erhalten, erfolgte keine Bremsung der Zentrifuge. Der entstandene Gradient aus PBMC wurde abgenommen und in zwei Schritten mit PBS gewaschen. Hierzu wurde im ersten Schritt eine Verdünnung auf 50 ml bei 1500 rpm für 10 Minuten, im zweiten Waschschrift eine Verdünnung auf 40 ml Gesamtvolumen bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese gezählt, in Aliquots mit der gewünschten Zellzahl aufgeteilt und in Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Die Feintypisierung der HLA-DPA1 und HLA-DPB1 Allele erfolgte durch das Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg.

#### 3.2.2 Isolation von RNA aus PBMC

Zur Extraktion der zytoplasmatischen RNA wurden die Zellen mit Hilfe des QIAGEN QIAShredders homogenisiert. Dazu wurden ca. 50 Millionen Zellen in 600 µl RLT-Puffer gelöst und für 2 Minuten bei 15000 rpm durch die Shreddersäule zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA aus dem Homogenisat durch das QIAGEN RNEasy Mini Kit nach Herstellerprotokoll. Die Elution der RNA wurde nach einer Inkubation von 30 µl Nuklease-freiem Wasser für 30 s durch eine Zentrifugation der mit RNA beladenen Säule bei 15000 rpm für 1 Minute erreicht.

### 3.2.3 Klonierung der HLA-DP Ketten

Aus der isolierten RNA wurde mittels einer Standard RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) eine cDNA hergestellt.

isolierte RNA	1 µg
dT <sub>23</sub> -oligo-dT Primer	2 µl
H <sub>2</sub> O	<u>x µl</u>
	10 µl

Nach dem vorsichtigen Mischen erfolgte die Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstrukturen der RNA durch eine Erhitzung auf 70°C für 5 Minuten. Daraufhin wurden 10 µl Reaction-Buffer und 2 µl Taq-Polymerase zugegeben. Die cDNA wurde bei 42°C für 60 Minuten amplifiziert und anschließend die Proteine bei 80°C für 5 Minuten denaturiert. Die entstandene cDNA wurde auf 50 µl Gesamtvolumen mit Nuklease freiem Wasser verdünnt.

HLA-DPB1\*03:01 wurde mit Hilfe von spezifischen Primern aus der cDNA amplifiziert. Der forward-Primer hatte die Sequenz 5'-CGCTAGTCTAGAACCATGATGGTTCTGCAG-3', der reverse-Primer die Sequenz 5'-ATACCGCTCGAGTTATGCAGATCCTCGTTG-3'. Die anderen HLA-DPA1 und -DPB1 Allele lagen bereits vor.

cDNA	4 µl
forward-Primer	1 µl (1:10 verdünnt)
reverse Primer	1 µl (1:10 verdünnt)
H <sub>2</sub> O	19 µl
Taq-Polymerase-Mix	<u>25 µl</u>
	50 µl

Die Initiation erfolgte durch ein Erhitzen der DNA auf 95°C für 1 Minute. Das Programm bestand aus einer 30 s dauernden Denaturierung bei 94°C, dem Annealing der Primer bei 60°C und der Synthese bei 68°C für je eine Minute. Das Programm wurde 35-mal wiederholt. Zum Abschluss folgte eine Phase von 68°C für 5 Minuten. Ein Gradient mit 5 verschiedenen Temperaturstufen zu +/- 5°C um 60°C ermöglichte verschiedene Annealingtemperaturen. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Gelelektrophorese auf einem 1%-igen Agarose Gel in TBE-Puffer und 1µl Roti-Safe überprüft. Dazu wurden 5 µl des Produkts mit 2 µl Roti-Safe und 5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und bei 120V, 80mA für 45 Minuten laufen gelassen. Das Gel wurde ausgelesen und die Temperaturstufe 60°C aufgrund der deutlichsten Bande selektiert.

## Material und Methoden

Das Reaktionsprodukt wurde durch die beiden Restriktionsendonukleasen XhoI und XbaI geschnitten und anschließend in den zuvor ebenfalls mit XhoI und XbaI verdauten und mit CIP dephosphorylierten Vektor pGEM4Z-64A (52) ligiert. Der Verdau wurde für ca. 12 Stunden bei 37°C nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

DNA	50 µl
CutSmart	7 µl
destilliertes H <sub>2</sub> O	7 µl
XhoI	3 µl
XbaI	<u>3 µl</u>
	70 µl

Die verdaute DNA konnte mit Hilfe einer PCR-Purification nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und anschließend bei 16°C über Nacht in den Vektor ligiert werden.

pGEM4Z-64A	1 µl
Insert	15 µl
Ligase-Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
T4 Ligase	<u>1 µl</u>
	20 µl

### 3.2.4 Transformation der Plasmid-DNA

Der entstandene Vektor wurde mittels einer Transformation in E.coli (JM-109) eingebracht. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA zu 10 µl angetauter Bakteriensuspension in SOB-Medium pipettiert und für 30 Minuten belassen. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock mit 42°C für 45 Sekunden, während dem die Zellmembran der Bakterien aufgrund der Porenbildung für die DNA durchlässig wird. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden auf Eis gekühlt. Zur Initiation des Wachstums wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C in 2 ml LB-Medium unter ständigem Schütteln (280 rpm) kultiviert. Das Ausplattieren der Suspension auf selektiven Agar mit Ampicillin (c=0,1 mg/ml) ermöglichte die Übernacht-Kultivierung von Kolonien die den Vektor pGEM-4Z-64A mit entsprechendem Insert enthielten, da sich auf dem Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin befindet.

### 3.2.5 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterienzellen

Aus den gewachsenen Kolonien wurden fünf Klone für eine weitere Kultur zur Vervielfältigung in selektivem LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 280 rpm selektiert. Nach der Zentrifugation über 10 Minuten bei 8°C mit 4000 rpm am nächsten Morgen konnte die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN QIAfilter Plasmid Mini Prep Kit nach Herstellerprotokoll isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte dabei mit Hilfe eines Anionentauschs an einer Säule, an die die DNA nach Lyse der Bakterienzellen bindet. Durch die Zugabe entsprechender Puffer konnte die DNA danach eluiert werden. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde dann mittels Spektrometrie ermittelt. Die so gewonnene DNA wurde anschließend mit Hilfe von XhoI und XbaI über Nacht verdaut.

DNA	5 µl
destilliertes H <sub>2</sub> O	12 µl
CutSmart	2 µl
XhoI	0,5 µl
XbaI	<u>0,5 µl</u>
	20 µl

Die verdauten Proben wurden zur Kontrolle auf die richtige Länge des Inserts auf ein Agarose-Gel analog zu Kapitel 3.2.2 aufgetragen. Alle fünf aufgetragenen Klone zeigten die richtige Länge des Inserts. Die DNA eines zufällig ausgewählten Klons wurde anschließend zur Sequenzanalyse an GATC-Biotech geschickt. Der direkte Vergleich der gewonnenen Sequenz zeigte eine Homologie zu HLA-DPB1\*03:01.

### 3.2.6 Amplifikation von Plasmid-DNA

Für alle in diesem Projekt verwendeten HLA-DPA1 und HLA-DPB1 Allele, die bis auf das isolierte HLA-DPB1\*03:01 bereits vorlagen, wurde eine erneute Transformation von Vektor-DNA in *E. coli* (JM-109) durchgeführt. Jeweils ein Klon der Bakterienkulturen wurde zufällig ausgewählt und damit eine Übertrag-Kultur aus 2 ml selektivem LB-Medium mit c=0,1 mg/ml Ampicillin angeimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C unter stetiger Bewegung mit 280 rpm. Daraus wurde anschließend eine Übernacht-Kultur in 100 ml selektivem LB-Amp.-Medium angeimpft. Hiernach erfolgte die Zentrifugation der Kultur bei 3500 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA lief nach Herstellerprotokoll für das QIAGEN QIAfilter Plasmid Midi Prep Kit ab. Die Konzentration der gewonnen DNA wurde durch ein Spektrometer ermittelt.

### 3.2.7 Linearisierung der DNA

Die amplifizierte Plasmid-DNA (pGEM4Z-64A-HLA-DPA1\*/-DPB1\*) wurde vor der *in vitro* RNA-Synthese durch die Restriktionsendonuklease SpeI bei 37°C über Nacht linearisiert. Die Linearisierung durch SpeI erfolgt im Vektor hinter dem Insert. Dieser Schritt dient dazu, die DNA so für die *in vitro*-Transkription vorzubereiten, dass die im T7 Ultra Kit enthaltene RNA-Polymerase an ihrem Promotor die Transkription an linearer DNA beginnen kann.

Vektor-DNA	20 µg
destilliertes H <sub>2</sub> O	x µl
CutSmart	2 µl (10x)
SpeI	<u>3 µl</u> 20 µl

### 3.2.8 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Plasmid DNA

Nach dem Enzymverdau der Vektor-DNA konnte die Aufreinigung durch eine Phenol-Chloroform Aufreinigung erfolgen. Das Verfahren ermöglichte das Auswaschen störender Proteine und Salze. Es beinhaltet 5 Waschschrte mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol sowie 5 Schritte nur mit Phenol. Innerhalb eines Waschschrtes wurde die DNA, die zuvor auf 400 µl mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, mit 400 µl der Waschlösung intensiv gemischt. Nach der Mischung erfolgte eine Zentrifugation mit 15000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand, der die DNA enthält, konnte abgenommen werden und einem neuen Waschschrte zugeführt werden. Nach den Waschschrten wurde die DNA mit Natriumacetat und Ethanol vermischt. Durch das Herunterkühlen auf -20°C für 2 Stunden erfolgte eine Präzipitation. Die ausgefallene DNA wurde nun mit Ethanol gewaschen und für 30 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet konnte nach kurzer Trocknung in RNase-freiem Wasser resuspendiert werden.

### 3.2.9 *In-vitro* Transkription von mRNA

Aus der linearisierten und aufgereinigten DNA wurde mit Hilfe des mMessage mMachine T7 Ultra Kit die für die Elektroporation notwendige mRNA synthetisiert. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Bei der Synthese wird anstatt einer klassischen Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA ein sogenanntes ARCA (anti reverse cap

## Material und Methoden

analog) angefügt, das die Translation verbessert (155). Im ersten Reaktionsschritt wurden Nuklease-freies Wasser, Nukleotidtriphosphate, ARCA, Reaktionspuffer, linearisiertes und aufgereinigtes DNA-Template und die RNA-Polymerase in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Werte in Klammern stehen jeweils für den 2,5-fachen Ansatz.

Nuklease-freies Wasser	x $\mu$ l
T7 2x NTP/ARCA	10 $\mu$ l (25 $\mu$ l)
T7 10x Reaction Buffer	2 $\mu$ l (5 $\mu$ l)
DNA-Template	x $\mu$ l 1 $\mu$ g (2,5 $\mu$ g) DNA-Menge
T7 Enzyme Mix	<u>2 <math>\mu</math>l (5 <math>\mu</math>l)</u> 20 $\mu$ l (50 $\mu$ l)

Dieser Reaktionsansatz wurde vorsichtig durchgemischt und für 2 Stunden bzw. 3 Stunden beim 2,5-fachen Ansatz bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das DNA-Template durch die Zugabe von 1  $\mu$ l Turbo DNase für 15 Minuten bei 1-fachem Ansatz und mit 2,5  $\mu$ l in 45 Minuten bei 2,5-fachem Ansatz verdaut. Die Polyadenylierung der RNA erfolgte nach dem Verdau der DNA.

T7 Ultra Kit Reaction	21 $\mu$ l (52,5 $\mu$ l)
Nuklease-freies Wasser	36 $\mu$ l (90 $\mu$ l)
5x E-PAP Puffer	20 $\mu$ l (50 $\mu$ l)
25 mM MnCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l (25 $\mu$ l)
ATP-Solution	<u>10 <math>\mu</math>l (25 <math>\mu</math>l)</u>
Entnahme zur Analyse	-2,5 $\mu$ l
E-PAP	<u>4 <math>\mu</math>l (10 <math>\mu</math>l)</u> 97,5 $\mu$ l (247,5 $\mu$ l)

Vor der Zugabe von *E. coli Poly(A) Polymerase I* (E-PAP) wurden jeweils 2,5  $\mu$ l für ein analytisches Gel der nicht polyadenylierten RNA entnommen. Nach Zugabe des Enzyms erfolgte die vorsichtige Mischung der Reaktion und die Inkubation bei 37°C für 1 Stunde. Die anschließende Aufreinigung des Reaktionsproduktes erfolgte mit dem QIAGEN RNEasy Mini Kit. Dazu wurden zur Reaktion des T7 Ultra Kits 700  $\mu$ l RLT-Puffer und 500  $\mu$ l Ethanol gegeben und die RNA nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, wobei die Elution der RNA mit Nuklease-freiem Wasser erfolgte. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration der RNA bestimmt und zu jeweils 10  $\mu$ g aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines analytischen Agarose-Gels der abgenommenen Probe überprüft.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Kulturbedingungen

So weit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und in mit Feuchtigkeit gesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden einem Mycoplasmentest unterzogen und bei Notwendigkeit mit Hilfe von Plasmocin® oder Plasmocure® behandelt.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte im beschriebenen Einfriermedium, die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden sie zunächst für kurze Zeit angetaut und anschließend in RPMI 1640 ohne Zusätze verdünnt. Diese Zellsuspension wurde gezählt und anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zielzellzahl im entsprechenden Zellmedium (Kapitel 3.3.2)

#### 3.3.2 Verwendete Zelllinien

##### *Adhärente humane Zelllinien*

Die Ablösung der Zellen erfolgte durch das Waschen der Kulturflasche mit sterilem PBS und einer anschließenden Inkubation mit 0,05% Trypsin-EDTA (1x). Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei 37°C wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend ausgesät.

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*	Referenz
HeLa	Zervixkarzinom	DMEM + 10%FCS	02:01	01:01	(156)
Sw480	Kolonkarzinom, Duke B	DMEM + 10%FCS	01:03/ 02:01	01:01/ 04:01	(157)
Saos2	Osteosarkom	DMEM + 10%FCS	01:03/ 02:01	01:01/ 04:01	(158)
HaCat	Keratinocyten	DMEM + 10%FCS	01:03	04:01	(159)
SK29mel	Malignes Melanom	DMEM + 10%FCS	01:03	04:01	(160)
HepG2	Differenziertes Hepatozelluläres Karzinom	MEM + 10% FCS + 2mM L-Glutamin	01:03	02:01/ 04:01	(161)

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten adhärennten humanen Zelllinien

In der Tabelle sind die verwendeten adhärennten humanen Zelllinien dargestellt. Das jeweils verwendete Zellkulturmedium wurde nach den Datenbanken des DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) oder ATCC (American Type Culture Collection) ausgewählt.

## Material und Methoden

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*	Referenz
HL-60	Promyelozytenleukämie (FAB: AML M3)	RPMI 1640 + 10%FCS	01:03/ 02:01	04:01/ 13:01	(162)
THP-1	Monozytäre akute Leukämie (FAB: AML M4)	RPMI 1640 + 10%FCS	01:03/ 02:02	02:01/ 04:02	(163)
KG-1	Akute Erythroleukämie (FAB: AML M6)	RPMI 1640 + 10%FCS	02:01/ 03:01	11:01/ 105:01	(162)
IM-9	Multiples Myelom	RPMI 1640 + 10%FCS	01:03	04:01	(164)
T2*	Hybrid aus B- und T-Zellen, durch EBV immortalisiert	RPMI 1640 + 20%FCS	-	-	(165)
MZ 683 LCL	Mit EBV immortalisierte B-Zellen aus PBMC des Donors 683 (FAB: AML M3)	RPMI 1640 + 20%FCS	02:01	04:01	
MZ 595 LCL	Mit EBV immortalisierte B-Zellen aus PBMC des Donors 595 (10/12 gematchter Stammzellspender zu Donor 683 mit non-permissivem HLA-DP Mismatch (147)	RPMI 1640 + 20%FCS	02:01	03:01	
EU-3	B-Zell Vorläuferleukämie	RPMI 1640 + 10% FCS	01:03	02:01/ 04:01	(166)
Ramos	Burkitt-Lymphom, 3 jähriger Patient	AIM-V + 10% HS	01:03	03:01/ 04:01	(167)
K562	Blastenkrise einer chronisch myeloischen Leukämie	RPMI 1640 + 20% FCS	01:03	02:01/ 04:02	(168)
Jurkat	Akute T-ALL	RPMI 1640 + 10% FCS	01:01/ 01:03	02:01/ 04:02	(169)
Jurkat-76	Akute T-ALL ohne endogenen T-Zell Rezeptor	RPMI 1640 + 10% FCS	01:01/ 01:03	02:01/ 04:02	(170)

\* T2 besitzen große Deletionen in Chromosom 6, ein Nachweis von HLA-DP ist nicht gelungen

Tabelle 5: **Übersicht über die verwendeten humanen Suspensionszelllinien**

In dieser Tabelle sind die verwendeten humanen Suspensionszellen dargestellt. Das jeweils verwendete Zellkulturmedium wurde nach den Datenbanken des DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) oder ATCC (American Type Culture Collection) ausgewählt.

## Material und Methoden

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium	Referenz
EL-4	Murine T-Zell Leukämie aus C57/B6	RPMI 1640 + 10%FCS	(171)
B16	Murines malignes Melanom	DMEM + 10% FCS	(172)
Murine DC	Stimuliert aus dem Knochenmark einer C57/BL6	RPMI + 10% FCS + 10% mGM-CSF	(173)
RAW	Murine Makrophagen	DMEM + 10% FCS	(174)
Schneider*	Drosophila melanogaster, Embryonenzellen	Schneider + 10% FCS*	(175)
CHO	Chinesischer Hamster, Ovarienzellen	F-12 K + 10% FCS	(176)
Cos-7	Grüne Meerkatze, Nierenzellen	DMEM + 10% FCS	(177)
LLC-PK1	Wildschwein, Nierenzellen	DMEM + 10% FCS	(178)

\*Schneider-Zellen wurden in 28°C in nicht CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre kultiviert.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Tierzelllinien

In der Tabelle sind die verwendeten Tierzelllinien dargestellt. Das jeweils verwendete Zellkulturmedium wurde nach den Datenbanken des DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) oder ATCC (American Type Culture Collection) ausgewählt.

### Humane T-Zellen

Nach der Isolation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kapitel 3.5) wurden diese in RPMI 1640 + 10% HS + 50 IU IL-2/ml + 5µl IL-7 + 5µl IL-15/ml und 5µl CD3/28 beads (1 Bead / 5 T-Zellen) pro Millionen Zellen resuspendiert. Die weitere Kultur der Zellen erfolgte in RPMI 1640 + 10 % HS + 50 IU IL-2/ml unter wöchentlicher Zugabe von CD3/28 beads.

### 3.4 Generation von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark

Die Generation der murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark wurde nach dem Protokoll von Lutz et al. (173) durchgeführt. Aus einer C57/BL6-Maus wurden Tibia und Femur herauspräpariert. Die Desinfektion der freipräparierten Knochen erfolgte für 90 Sekunden in Isopropanol. Nach dem Waschen der Knochen in PBS wurden beide Enden aufgetrennt. Die Elution des Knochenmarks erfolgte mit aufgewärmtem RPMI 1640 +10% FCS. Dazu wurden ungefähr 8 ml des aufgewärmten Mediums mit Hilfe einer Kanüle 0,4 x25mm in den Knochen gespritzt und die ausfließende Zellsuspension in einem sterilen Behältnis aufgefangen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 1500 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Generation von murinen dendritischen Zellen erfolgte die Aussaat von je 2 Millionen Zellen in P10-

## **Material und Methoden**

Petrischalen mit je 10 ml RPMI 1640 + 10% FCS + 30 mmol/l Hepes-Puffer + 120 IU/ml Penicillin und 0,12 mg/ml Streptomycin + 10% murinem GM-CSF. Nach 72 Stunden wurden 10 ml Kulturmedium zugegeben. An den Tagen 4, 6 und 8 wurden jeweils 10 ml des Kulturmediums ausgewechselt. Die Stimulation war nach 10 Tagen abgeschlossen.

### **3.5 Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC**

Zur Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC gesunder Spender wurden CD4 Microbeads<sup>®</sup> verwendet. Bei diesem Verfahren binden mit Hilfe von dextranhaltigen Eisenstrukturen markierte Antikörper an spezifische Strukturen der Zielzelle. Durch die Bindung der markierten Zellen an einer magnetisierten Stahlwollensäule und anschließende Elution können die Zellen isoliert werden (179). Die aufgetauten PBMC wurden dazu gewaschen und gezählt. Für 10 Millionen Zellen, die in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen waren, wurden jeweils 40 µl Microbeads verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C wurden 10 ml Puffer zu dieser Suspension gegeben und die Zellen anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 500 µl eisgekühlter Pufferlösung. Die Zellen konnten jetzt in die mit 3 ml Puffer equilibrierte LS-Säule gegeben werden. Anschließend wurde die Säule 3-mal mit jeweils 3 ml Puffer gewaschen. Die Elution der Zellen erfolgte mit 10 ml Puffer durch Druck auf den Kolben der LS-Säule. Anschließend wurden die isolierten Zellen gezählt, gewaschen und ausgesät.

### **3.6 Herstellung von Zelltrümmern/Zellresten durch die Freeze-Thaw Methode**

Zur Herstellung der Zelltrümmer ohne weitere Zusätze, die für die Beladung muriner dendritischer Zellen verwendet wurden, kam die Einfrier-Auftau- (Freeze-Thaw)-Methode zum Einsatz. Dabei werden die Zellen ohne osmotische Stabilisierung schnell gefroren. Der durch die Eiskristalle entstehende osmotische Gradient führt zu einer Lyse der Zellen. Jeweils 6 Millionen Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach 2 Minuten wurden sie in 37°C warmem Wasser erwärmt, bis sie aufgetaut waren. Der Wechsel zwischen Einfrieren und Auftauen wurde 4-mal wiederholt.

### 3.7 Elektroporation

Die Expression des TZR bzw. von HLA-DP Allelen wurde durch das Einbringen von aufgereinigter in-vitro transkribierter (IVT) RNA mittels Elektroporation in die jeweiligen Zellen erreicht. Bei diesem Verfahren gelangt die polare RNA über elektrisch induzierte Membrananomalien in die jeweilige Zelle (180). Hierzu wurden etwa 5-6 Millionen Zellen in OptiMEM® zu 10 µg der vorgelegten mRNA in eine 4 mm Elektroporationsküvette gegeben und anschließend mit 500 V/5 ms/Square wave Puls für humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. 400 V/5 ms/Square wave Puls für humane und murine Zelllinien elektroporiert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellen ohne RNA (Mock) elektroporiert.

### 3.8 Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle der TZR bzw. HLA-DP Expression nach der Elektroporation, aber auch zur Zielanalyse, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei binden an Fluorochrome gekoppelte Antikörper spezifisch an ein gewünschtes Antigen auf den zu untersuchenden Zellen. Diese können, angeregt durch bestimmte Wellenlängen von Lasern, spezifische Frequenzen an Licht emittieren. Die Emission wird aufgezeichnet und spiegelt die Antikörperdichte auf der Zelloberfläche wieder, was Rückschlüsse auf die Expressionsdichte des zu untersuchenden Antigens zulässt. Die T-Zellen wurden auf die Expression des eingebrachten TZR<sub>11C12</sub> mit dem Vβ-Subfamilien-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb) Vβ13.2 geprüft. Die HLA-DP Expression wurde indirekt mittels des HLA-DP spezifischen mAb B7/21 analysiert. Zur Messung auf Mauszellen wurde zusätzlich ein FcR-Block angewandt, um unspezifische Effekte von gebundenen Antikörpern zu vermeiden. Die Expressionen von HLA-DR und HLA-DQ wurden ebenfalls indirekt über die Antikörper Hb55 und SpVL6 nachgewiesen. Die Sekundärfärbung der unkonjugierten Antikörper erfolgte mit dem mAb goat anti mouse-FITC. Die Analyse auf Expression des *Invariant Chain Peptides* (CLIP) erfolgte durch einen monoklonalen rekombinanten humanen Antikörper gegen CLIP. Murines CD11c wurde durch einen mit FITC-konjugierten Antikörper gemessen. Die Färbung der Zellpopulationen erfolgte nach Standardverfahren bzw. Herstellerangaben. Als Durchflusszytometer diente der BD FACSCalibur und die anschließende Auswertung der Daten erfolgte mittels der FlowJo Software. Die rMFI der HLA-DP Expression (relative mittlere Fluoreszenzintensität) wurde als Quotient aus dem Median

## Material und Methoden

der Fluoreszenzintensität zwischen  $\alpha$ -DP (B7/21) +  $\gamma$ -FITC und Isotyp IgG<sub>3</sub> +  $\gamma$ -FITC berechnet.

### 3.9 ELISpot

Die Analyse der Epitoperkennung durch T-Zellen mit dem TZR<sub>11C12</sub> wurde durch einen IFN- $\gamma$  ELISpot durchgeführt. Dazu wurde eine Kokultur aus CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub> bzw. Mock transfizierten T-Zellen und Zielzellen in einem Effektor (T-Zellen) zu Zielzell-Verhältnis von 0,6:1 für 20h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 + 10% HS angesetzt. Die 96-Well Kulturplatte war mit einer Polyvinylidenflouridbeschichtung ausgestattet. Diese war nach einer Vorwässerung mit 35% Ethanol während einer Übernachtinkubation bei 4°C in der Lage, den am F<sub>c</sub> Teil hydrophoben Antikörper anti-human-IFN $\gamma$ -mAb-1-D1K binden. IFN- $\gamma$ , das durch aktivierte T-Zellen sezerniert wird, konnte so gebunden werden. Nach 20h Kokultur wurden die Zellen abgewaschen und der Zweitantikörper, anti-human-IFN- $\gamma$ -7-B6-1-Biotin, zugegeben. Dieser band das auf der Platte gebundene IFN- $\gamma$ . An den mit Biotin ausgestatteten Antikörper wurde nun eine Mischung vorinkubierter Peroxidase mit Streptavidin gebunden. Die Färbereaktion durch 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, gelöst in Dimethylformamid mit 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, erzeugte ein rotes, ausfallendes Produkt. Über den C.T.L ELISpot Reader konnten die entstehenden Ausfällungsherde als Orte von gebundenem IFN- $\gamma$  anschließend aufgenommen und gezählt werden. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism und Microsoft Excel.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expressionsanalyse des TZR<sub>11C12</sub>

Für die Charakterisierung von TZR<sub>11C12</sub> wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender mit der TZR  $\alpha/\beta$  kodierender mRNA elektroporiert. Die anschließende Expressionskontrolle erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurde 14 Stunden nach der Elektroporation die Färbung der  $\beta$ -Kette des eingebrachten T-Zell Rezeptors mit Hilfe des TZR-Subfamilien-spezifischen Antikörpers V $\beta$  13.2 PE für den TZR<sub>11C12</sub> vorgenommen. CD4 wurde zusätzlich angefärbt, um die Expression auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verdeutlichen und die Reinheit der Zellpopulation zu kontrollieren. Die Analyse der Expressionsdaten zeigt, dass der TZR<sub>11C12</sub> nach Elektroporation jeweils stark auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wurde (Abb. 8).

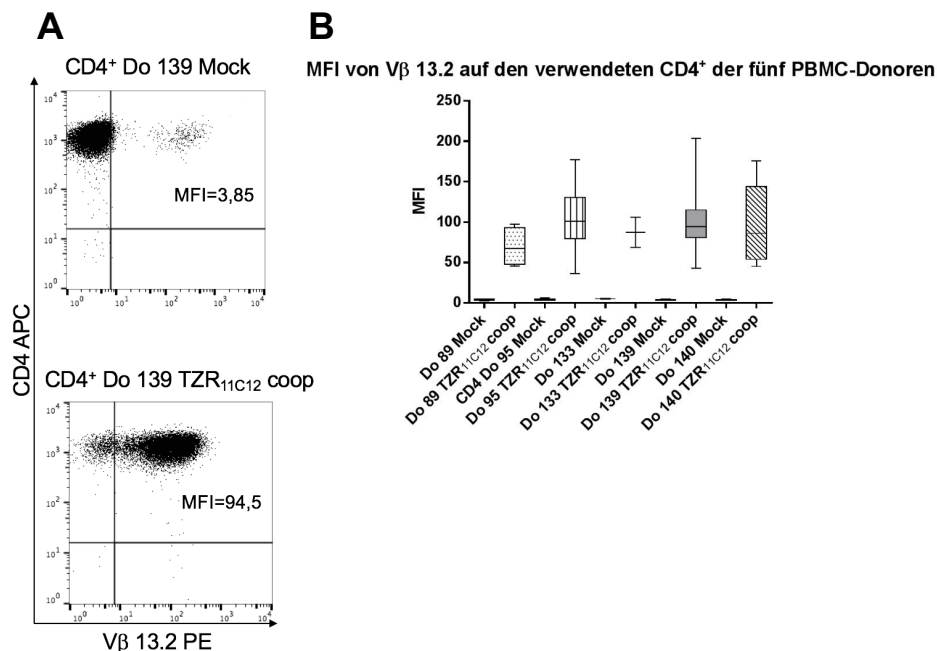


Abbildung 8: Expression von TZR<sub>11C12</sub> in den fünf verwendeten CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Donoren

(A) Der durchflusszytometrische Nachweis der Expression von TZR<sub>11C12</sub> auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte jeweils 14 Stunden nach der Elektroporation mit Hilfe des subfamilienspezifischen Antikörper V $\beta$  13.2 PE. Um die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu zeigen, wurde zusätzlich noch mit einem anti-CD4-APC gefärbt. Abgebildet ist exemplarisch das Ergebnis einer Elektroporation. (B) Gezeigt ist die Auswertung der Expression von TZR<sub>11C12</sub> aller durchgeführten Experimente des Projektes. Für Do 89 liegen 6 Messungen, für Do 95 21 Messungen, für Do 133 2 Messungen, für Do 139 14 Messungen und für Do 140 14 Messungen vor. Die Expressionsdaten unterschiedlicher Donoren wurden gepoolt. Mock steht für CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die ohne RNA (Mock) elektroporiert wurden. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch über die Färbung mit V $\beta$  13.2 PE. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität für den Kanal FL-2, in dem V $\beta$  13.2-PE gemessen wurde. Der Kasten des Plots umfasst jeweils den Quartilenbereich mit markiertem Median. Als Fühler sind jeweils Maximal- und Minimalwert eingezeichnet.

Die Auswertung dieser Daten belegt, dass die Elektroporation als zuverlässige Methode zur Expression des TZR<sub>11C12</sub> in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet werden kann.

### 4.2 Test der drei AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und KG-1 auf ihre Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> elektroporierte T-Zellen

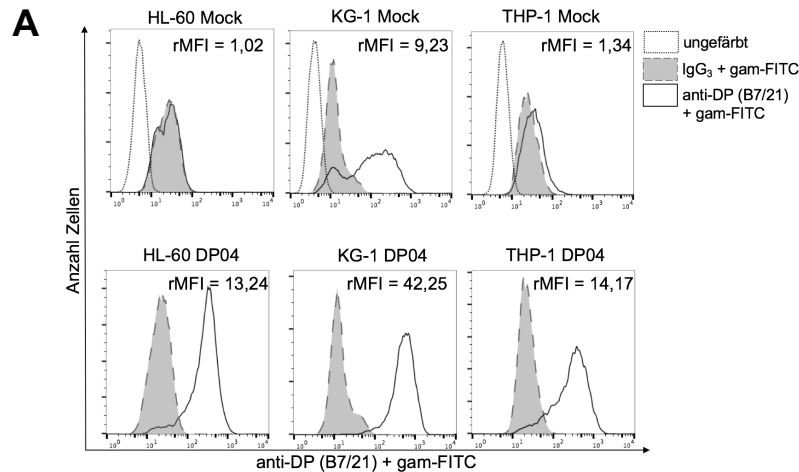
Da der TZR<sub>11C12</sub> für die adoptive T-Zell Therapie der AML angewendet werden soll, wurden zunächst Leukämieblasten *in vitro* auf ihre Erkennung überprüft. Dafür wurde die IFN- $\gamma$ -Sekretion von TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den etablierten AML-Zelllinien HL-60 (akute Promyelozytenleukämie, AML M3) (162), KG-1 (akute Erythroleukämie, AML M6) (162) und THP-1 (akute myelomonozytäre Leukämie, AML M4) (163) getestet. Dadurch sollten erste Rückschlüsse auf die Erkennung zellassoziierter Faktoren, wie beispielsweise HLA-DPB1\*04:01 restringierte Leukämie-assoziierte Peptide gewonnen werden. Als Positivkontrolle diente die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL. Der Test der HLA-DPB1\*04:01 negativen MZ 595 LCL zeigt die Erkennung von EBV-Peptiden durch das endogene TZR-Repertoire der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an.

Die Feintypisierung der Zelllinien ergab, dass HL-60 für die HLA-DPB1\* Allele 13:01/04:01, THP-1 für HLA-DPB1\*02:01/04:02 und KG-1 für HLA-DPB1\*11:01/105:01 positiv sind. Die untersuchten Zelllinien zeigten durchflusszytometrisch ein heterogenes Bild der HLA-DP Expression auf ihrer Oberfläche. Auf HL-60 (rMFI=1,02) und THP-1 (rMFI=1,34) konnte ohne vorherige Veränderung kaum HLA-DP nachgewiesen werden, deutlich dagegen auf KG-1 (rMFI=9,23) (Abb. 9 A). Durch die Elektroporation konnte in allen drei untersuchten Zelllinien eine HLA-DP Überexpression von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 erreicht werden (Abb. 9 A). Das entspricht einer Steigerung der HLA-DP Expression um den Faktor von etwa 13 in HL-60, von etwa 10 in THP-1 und von etwa 4,5 in KG-1. Eine 24-stündige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ , die zur Hochregulation von HLA-Allelen auf der Zelloberfläche führt, zeigte keine Effekte auf die endogene HLA-DP Expression in diesen Zelllinien (nicht dargestellt).

Im IFN- $\gamma$  ELISpot mit TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von drei unterschiedlichen T-Zell-Donoren wurden alle drei Zelllinien bereits ohne HLA-DP Elektroporation in unterschiedlichem Ausmaß erkannt. HL-60 zeigte eine spezifische Erkennung mit 174,50 (SD  $\pm$ 20,11) Spots, THP-1 mit 326,17 (SD  $\pm$ 12,27) Spots und KG-1 mit 515,67 (SD  $\pm$ 47,47 Spots) (Abb. 9 B). Das hohe Maß an Erkennung von KG-1 Zellen ohne endogene HLA-DPB1\*04:01 Expression lässt sich durch die Ähnlichkeit des von KG-1 getragenen HLA-DPB1\*105:01 zu HLA-DPB1\*04:01 erklären. HLA-DPB1\*105:01 unterscheidet sich lediglich in 3 Basen von HLA-DPB1\*04:01. Nach der Transfektion von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 ließ sich die IFN- $\gamma$  Sekretion der T-Zellen für alle drei AML-

## Ergebnisse

Zelllinien nochmals steigern (556,33 (SD  $\pm$ 34,36) Spots für HL-60, 671,00 (SD  $\pm$ 35,73) Spots für KG-1 und 584,67 (SD  $\pm$ 31,78) Spots für THP-1 (Abb. 9 B)). Mock CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten lediglich eine geringe unspezifische Erkennung der AML-Zelllinien. Die von der HLA-DPB1\*04:01 positiven MZ 683 LCL gestellte Positivkontrolle zeigte eine deutliche Erkennung im ELISpot (Abb. 9 B).



**B**  
**IFN- $\gamma$  Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den AML-Zelllinien THP-1, KG-1 und HL-60**

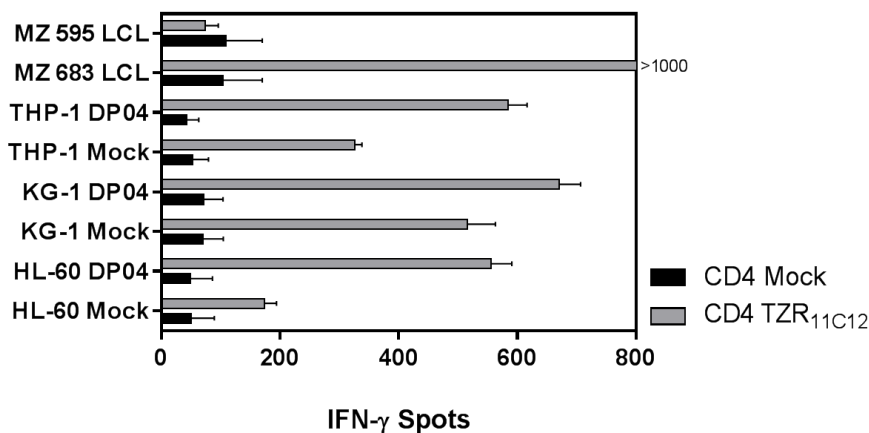


Abbildung 9: Test der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und KG-1

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Expression von HLA-DP 14 Stunden nach der Elektroporation. Diese wurde mit Hilfe des Hybridomantikörpers a-DP B7/21 und einer Sekundärfärbung durch gam-FITC ermittelt. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. (B) Die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> Mock bzw. TZR<sub>11C12</sub> wurde mit Hilfe des ELISpot durch eine 20 stündige Kokultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Mit diesem Ergebnis lässt sich zeigen, dass mit TZR<sub>11C12</sub> elektroporierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind AML-Zellen, die das HLA-DPB\*04:01 exprimieren, spezifisch zu erkennen. Als weitere Zielstruktur konnte zudem HLA-DPB1\*105:01 identifiziert werden, das von KG-1 getragen wird. Eine Eingrenzung auf ein einzelnes HLA-DPB1\*04:01 restringiertes leukämiespezifisches Peptid ist aus diesen Daten nicht möglich.

### 4.3 Test unterschiedlicher HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 exprimierender humaner Zelllinien auf ihre Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub>

Die von einem TZR erkannte Struktur kann im Kontext der Alloreaktion sowohl vom HLA selbst als auch vom Komplex aus Peptid und HLA ausgehen (121).

Für die Untersuchung des TZR<sub>11C12</sub> war es daher notwendig, mögliche Zielpeptide zu identifizieren oder die Peptidunabhängigkeit aufzuzeigen. Dazu wurden in diesem Versuch Zelllinien unterschiedlichster Herkunft (hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen) mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporiert, deren anschließende Expression durchflusszytometrisch ermittelt und auf ihre Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> tragende CD4<sup>+</sup> T-Zellen im IFN- $\gamma$  ELISpot getestet.

APC, wie etwa dendritische Zellen oder B-Zellen, prozessieren das HLA-DP dabei anders als nicht APC. In den APC wird das Peptid, das in HLA-DP liegt, über HLA-DM und HLA-DO selektiert, sodass an der Zelloberfläche nur hochaffin bindende Peptide in der Bindetasche des HLA-DP zu finden sind (106,108,109,181). Nicht APCs zeigen dagegen eine Beladung des HLA-DP mit unspezifischen Peptiden aus dem endoplasmatischen Retikulum (182). Wenn HLA-DP Moleküle nicht peptidbeladen sind, degradieren sie sehr schnell und erscheinen nicht an der Zelloberfläche (106). In diesem Versuchsaufbau wurden lymphatische und nicht lymphatische Zelllinien überprüft. Bei EU-3 handelt es sich um eine B-Zell Vorläuferleukämie (166), Ramos stammen aus einem Burkitt-Lymphom (167), T2 sind EBV-positive Hybride aus B- und T-Zellen (165) und IM-9 sind EBV-positive Zellen eines multiplen Myeloms (164). Getestet wurden zusätzlich die nicht-hämatopoetischen Zelllinien HeLa, (Zervixkarzinom) (156), Sw480 (Kolonkarzinom) (157), SK29mel (malignes Melanom) (160,183) und Saos 2<sub>Clone6</sub> (Osteosarkom). Saos2<sub>Clone6</sub> Zellen enthalten stabil transduziertes MDM2 (184). Diese Zellauswahl ermöglichte die Abdeckung eines großen Spektrums von HLA-DP beladenen Peptiden. Positivkontrolle ist die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL. Die HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL diente wiederum als Negativkontrolle.

Bereits vor der Elektroporation trugen EU-3 (rMFI 23,32 (SD  $\pm$ 10,0)), Ramos (rMFI 3,81 (SD  $\pm$ 0,78)) und IM-9 (rMFI 14,16 (SD  $\pm$ 6,19)) HLA-DPB1\*04:01 auf ihrer Oberfläche (Abb. 10), sodass hier bereits unabhängig vom exogen eingebrachten HLA-DP eine Erkennung erwartet wurde. Alle anderen Zelllinien zeigten keine HLA-DP Expression vor der Transfektion (Abb. 10), auch wenn sie das HLA-DPB1\*04:01 Allel in ihrem Genom kodierten. In allen Zelllinien konnte das HLA-DP durch die Elektroporation deutlich überexprimiert werden (Abb. 10).

## Ergebnisse

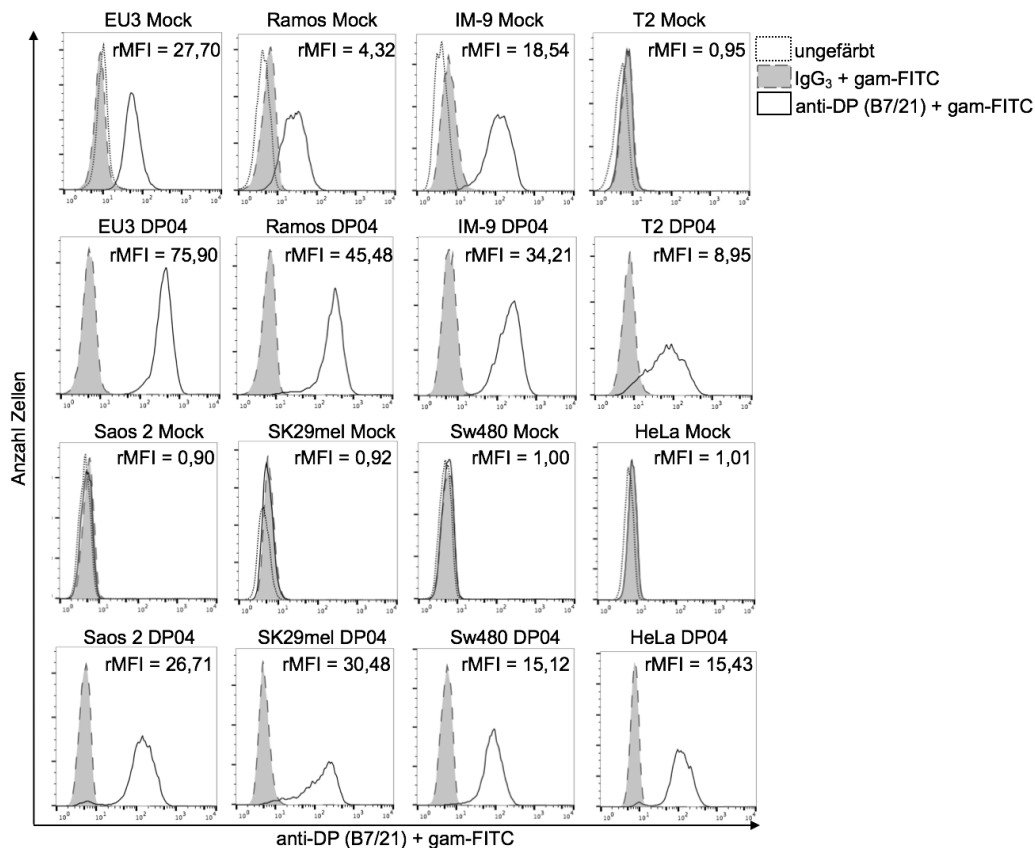


Abbildung 10: **Expression von HLA-DP auf verschiedenen humanen Zelllinien nach der Elektroporation**

14 Stunden nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 wurde die HLA-DP Expression auf den genannten Zielzellen mit Hilfe des Hybridomantikörpers a-DP B7/21 gemessen, der sekundär mit Hilfe von gam-FITC angefärbt wurde. Als Isotypkontrolle wurde ein IgG<sub>3</sub> Antikörper eingesetzt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 transfizierte Zellen.

Die Positivkontrolle MZ 683 LCL wurde mit über 1000 Spots/well durch TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Die nicht APC-Zelllinien HeLa, SK29mel und Saos2<sub>Clone6</sub> wurden nach der Elektroporation mit über 1000 Spots spezifisch durch TZR<sub>11C12</sub> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt, es zeigte sich keine unspezifische Erkennung durch Mock (ohne RNA) transfizierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 11). Sw480 wurde von allen drei Donoren nach der Elektroporation mit 262,17 (SD ±168,73) Spots erkannt. Die Erkennung ergab ebenfalls keinen Hintergrund durch die unveränderten CD4<sup>+</sup>-Populationen (Mock). Ein Donor zeigte jedoch eine spezifische Erkennung von nur 49 (SD ±1,41) Spots, was die hohe Standardabweichung erklärt (Abb. 11).

Die APC-Zelllinien Ramos, IM-9 und EU-3 wurden, wie erwartet, bereits ohne Überexpression von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 erkannt (Abb. 11). Bei EU-3 und IM-9 erzeugten die TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bereits ohne Veränderung der Zielzellen über 1000 Spots, Ramos wurden ohne zusätzliche HLA-DPB1\*04:01-Expression mit 291,33 (SD ±71,65) Spots erkannt. Nach der Elektroporation zeigten sich für alle drei Zelllinien >1000 Spots/well bei CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub> (Abb. 11). Nicht veränderte CD4<sup>+</sup> T-

## Ergebnisse

Zellen (Mock) zeigten lediglich eine unspezifische Erkennung der Zielzellen. TZR<sub>11C12</sub> erkannte keine HLA-DPB1\*04:01 negative Zelllinie. T2, die eine defekte HLA-Klasse II Beladungsmaschinerie besitzen und EBV-positiv sind (107,165), zeigten ohne -DPB1\*04:01 Elektroporation lediglich eine sehr schwache a.e. EBV-assoziierte „unspezifische“ Erkennung mit 15,67 (SD ±20,83) Spots. Mit den eingebrachten HLA-DPA1\*01:03 /-DPB1\*04:01 Ketten zeigten sie tendenziell einen höheren Hintergrund von 57,50 (SD ±42,97) Spots (Abb. 11).

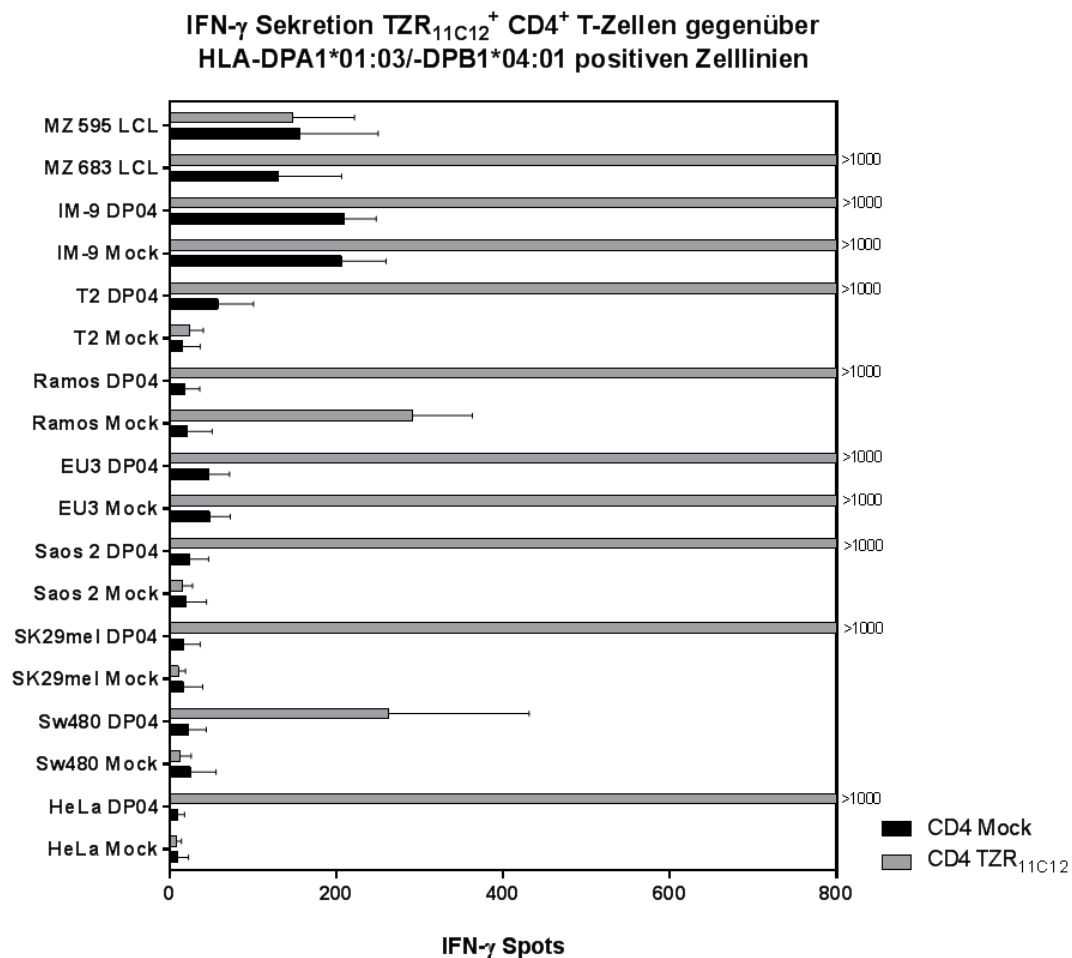


Abbildung 11: Erkennung humaner hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zelllinien durch TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor und nach Elektroporation mit dem HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01-Allel

Die spezifische Erkennung verschiedener Zelllinien wurde im IFN- $\gamma$  ELISpot durch eine 20-stündige Kokultur von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Der TZR<sub>11C12</sub> erkannte das HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 in allen Zelllinien. Damit erkennt der Rezeptor seine Zielstruktur unabhängig von der Trägerzelle. Daraus ergibt sich, dass TZR<sub>11C12</sub> entweder das HLA-DP peptidunabhängig erkennt, oder ein konstitutiv in HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 beladenes Peptid erkennt.

#### 4.4 Nachweis von CLIP auf THP-1

Um die Hypothese der Peptidunabhängigkeit weiter zu prüfen, erfolgte eine genauere Analyse der Zelllinie THP-1. Sie besitzt einen speziellen Immunevasionsmechanismus und trägt keine AML-spezifischen Peptide auf ihren HLA-Klasse II. Durch eine defekte HLA-Klasse II Beladungsmaschinerie, trägt sie eine Platzhalterstruktur, das sog. *Invariant Chain Peptide* (CLIP), anstelle von Peptiden auf ihren HLA-Klasse II Molekülen (101). Dieses wird unter physiologischen Bedingungen in den professionell antigen-präsentierenden Zellen im endosomalen Kompartiment durch HLA-DM entfernt und durch hochaffin bindende Peptide ersetzt (101,107,109).

Die durchflusszytometrische Analyse unveränderter THP-1 auf ihre CLIP-Expression zeigte eine heterogene Expressionsdichte in der Zellpopulation. Das CLIP konnte auf nahezu allen HLA-Klasse II nachgewiesen werden (Abb. 12). Relativ zur Isotypenkontrolle ergab sich ein rMFI von 52,88 (SD  $\pm$ 12,70) für drei Messungen. Nach der Elektroporation von HLA-DPA1\*01:03/ -DPB1\*04:01 in drei Versuchen konnte die Oberflächenexpression des CLIP tendenziell auf einen rMFI von 57,86 (SD  $\pm$ 16,23) etwas erhöht werden. Die Expression von HLA-DR und -DQ veränderte sich durch die vermehrte Expression von HLA-DP nicht weiter (Abb. 12). Im dargestellten exemplarischen Beispiel erscheinen damit 92,9% aller THP-1 HLA-DP und CLIP positiv (Abb. 12).

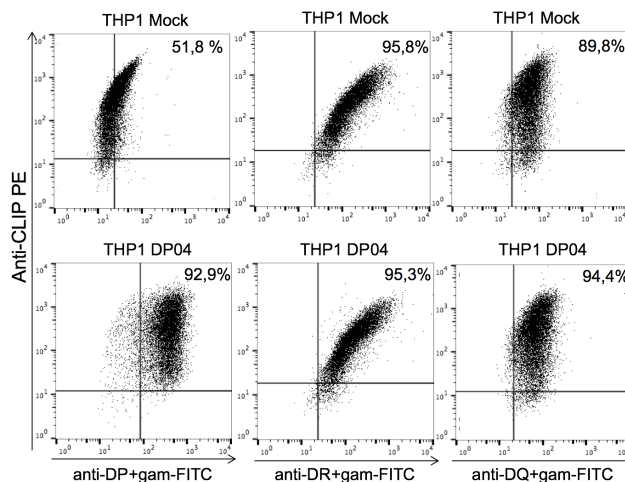


Abbildung 12: Nachweis des CLIP mittels anti-CLIP PE auf THP-1 Zellen nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 auf den HLA-Klasse II HLA-DR, -DQ und -DP

Durchflusszytometrischer Nachweis der CLIP-Expression auf den HLA-Klasse II von THP-1. Die Färbung erfolgte etwa 14 Stunden nach Elektroporation. DP04 steht für die mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zelllinie, Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. HLA-DP, HLA-DR und HLA-DQ sind jeweils mit dem entsprechenden Hybridantikörper gebunden worden, was anschließend über eine Sekundärfärbung mit gam-FITC nachgewiesen wurde. CLIP wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gebunden.

Nach der Überexpression von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 konnte die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> von 326,17 (SD  $\pm$ 12,27) auf 584,67 (SD  $\pm$ 31,78) Spots (Kapitel 4.2)

## Ergebnisse

deutlich erhöht werden. Die Erkennung von THP-1 ohne transfiziertes HLA-DPB1\*04:01 durch TZR<sub>11C12</sub> ist auf die bereits vorhandene Expression von HLA-DPB1\*04:02 zurückzuführen.

### **4.5 Test verschiedener HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 exprimierender Tierzelllinien auf ihre Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub>**

Die Versuche mit verschiedenen humanen Zelllinien als Träger von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 haben gezeigt, dass TZR<sub>11C12</sub> ein breites Spektrum von humanen Zielzellen erkennt. Dadurch sind viele Peptide aufgrund spezifischer und unspezifischer Beladungsmechanismen abgedeckt worden. Zur weiteren Testung der Peptidunabhängigkeit des Rezeptors erfolgte die Expression des HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 in verschiedenen Zelllinien tierischen (xenogenen) Ursprungs, wobei die Expression durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Die Erkennung dieser Zielzellen wurde durch den Nachweis der Zytokinsekretion im IFN- $\gamma$  ELISpot mit CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub> überprüft. Der Test sollte außerdem noch die Abhängigkeit der TZR<sub>11C12</sub>-HLA-DPB1\*04:01 Interaktion von humanen Faktoren aufdecken. Es wurden Cos-7 aus Affen (177), CHO aus dem Hamster (176), LLC-PK1 aus Schweinen (178), EL-4, B16 und RAW 264.7 aus Mäusen (171,172,174) und Schneider-Zellen aus *Drosophila melanogaster* (175) getestet. Als Positivkontrolle diente die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL, als Negativkontrolle wurde die HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL eingesetzt.

Die Expression des HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 gelang in allen Zelllinien. Die Affenierenzellen Cos-7 zeigten eine geringe unspezifische anti-DP (B7/21) Bindung. Durch die Einbringung des HLA-DP wurde der rMFI im gleichen Kanal deutlich erhöht (rMFI = 11,10) (Abb. 13). Auf allen anderen Zelllinien band der anti-DP Antikörper ohne vorherige Veränderung nicht (Abb. 13). Am stärksten konnte die Expression nach Elektroporation auf CHO-Zellen (rMFI = 43,50) gesteigert werden. Die Expression auf RAW (rMFI = 3,76) und Schneider-Zellen (rMFI = 2,29) gelang dagegen nur schwach (Abb. 13).

## Ergebnisse

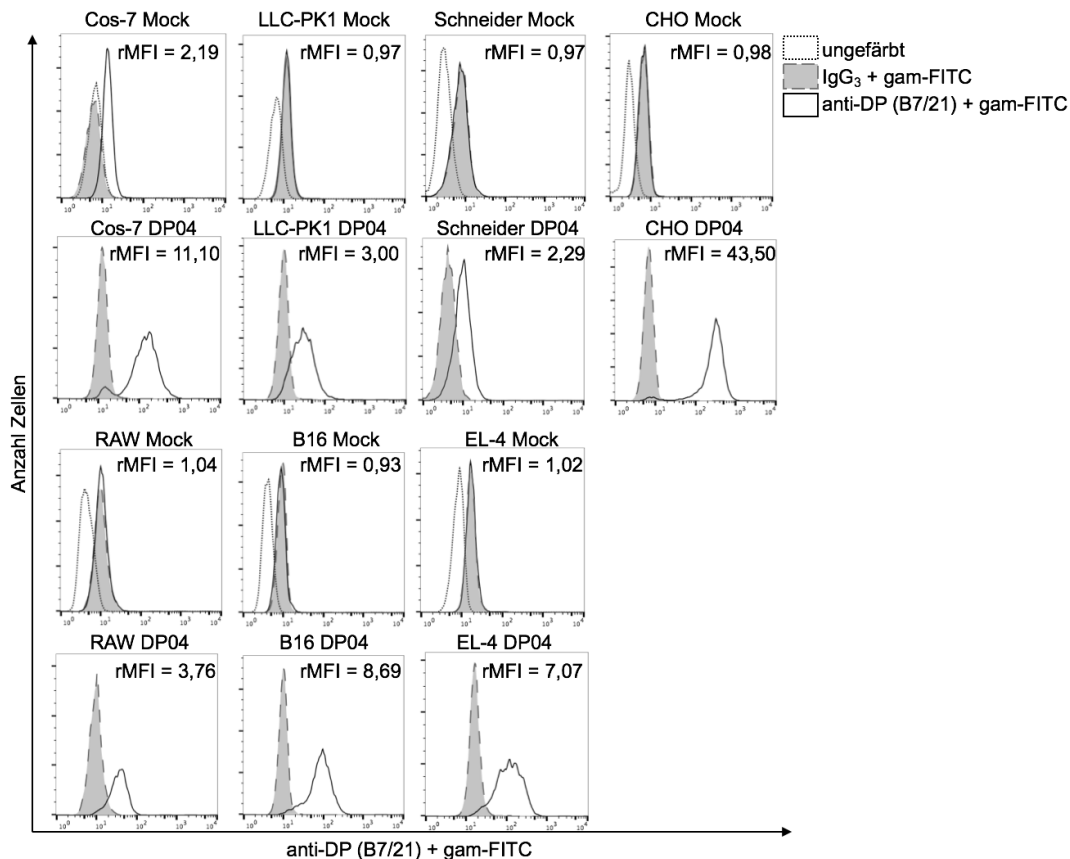


Abbildung 13: **Expression von HLA-DP auf den getesteten Tierzelllinien**

Durchflusszytometrischer Nachweis der HLA-DP Expression etwa 14 Stunden nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01. Dazu wurde das HLA-DP mit Hilfe des Hybridomantikörpers a-DP B7/21 gebunden, der sekundär mit Hilfe von gam-FITC angefärbt wurde. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. DP04 steht für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen.

Im IFN- $\gamma$  ELISpot mit TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von drei PBMC-Donoren konnte eine spezifische Erkennung nachgewiesen werden. Die mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zelllinie Cos-7 wurde von TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 751,83 (SD  $\pm$ 23,02) Spots gegenüber einem Hintergrund von 39,80 (SD  $\pm$ 28,75) Spots für die nichtelektroporierte Zelllinie erkannt (Abb. 14). LLC-PK1 wurden, wenn sie HLA-DPB1\*04:01 exprimierten, ebenfalls spezifisch von TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 174,33 (SD  $\pm$ 50,33) Spots erkannt, während die Hintergrunderkennung der unveränderten Zelllinien sehr klein war. RAW, B16 und Schneider-Zellen wurden dagegen nicht spezifisch durch den Rezeptor erkannt. Die HLA-DP exprimierende CHO-Zelllinie zeigte gegen CD4<sup>+</sup> mit TZR<sub>11C12</sub> 216,50 (SD  $\pm$ 49,33) Spots (Abb. 14). Allerdings ist diese Erkennung am ehesten als unspezifische Reaktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu werten, da die Erkennung der unveränderten CHO-Zellen mit 136,50 (SD  $\pm$ 53,22) Spots sehr groß ist. Bei EL-4 ergab sich eine ebenfalls unspezifische Erkennung von 44,17 (SD  $\pm$ 15,35) Spots der unveränderten Zelllinie und einer Erkennung mit 61,17 (SD  $\pm$ 12,21) Spots nach Elektroporation (Abb. 14).

## Ergebnisse

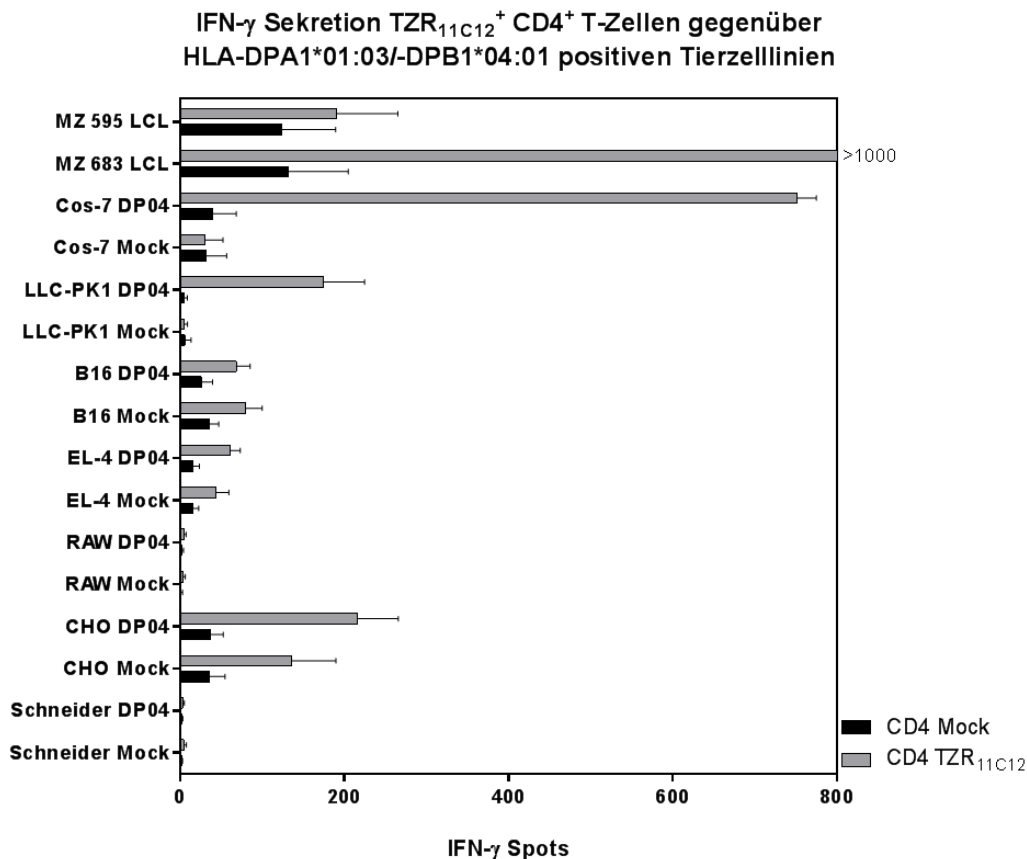


Abbildung 14: Erkennung der mit und ohne RNA elektroporierten Tierzelllinien gegen TZR<sub>11C12</sub> im ELISpot

Die spezifische Erkennung verschiedener Tierzelllinien wurde im IFN- $\gamma$  ELISpot durch eine 20-stündige Kokultur von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass TZR<sub>11C12</sub> das HLA-DPB1\*04:01 lediglich in Tumorzelllinien aus Affen und Schweinen erkennt. Dieses Ergebnis zeigt eine mögliche Beeinflussung der Erkennung durch posttranslationale Modifikationen oder anderer humaner Faktoren der TZR-HLA Interaktion.

### 4.6 Überprüfung der Erkennung muriner dendritischer Zellen als Träger des HLA-DP

Da nach den Versuchen mit xenogenen Zelllinien unklar war, weshalb murine Zellen nicht spezifisch erkannt werden, sollten zusätzlich gesunde murine dendritische Zellen getestet werden. Diese wurden durch die Stimulation mit murinem GM-CSF aus murinem Knochenmark von C57/BL6 Mäusen generiert (173).

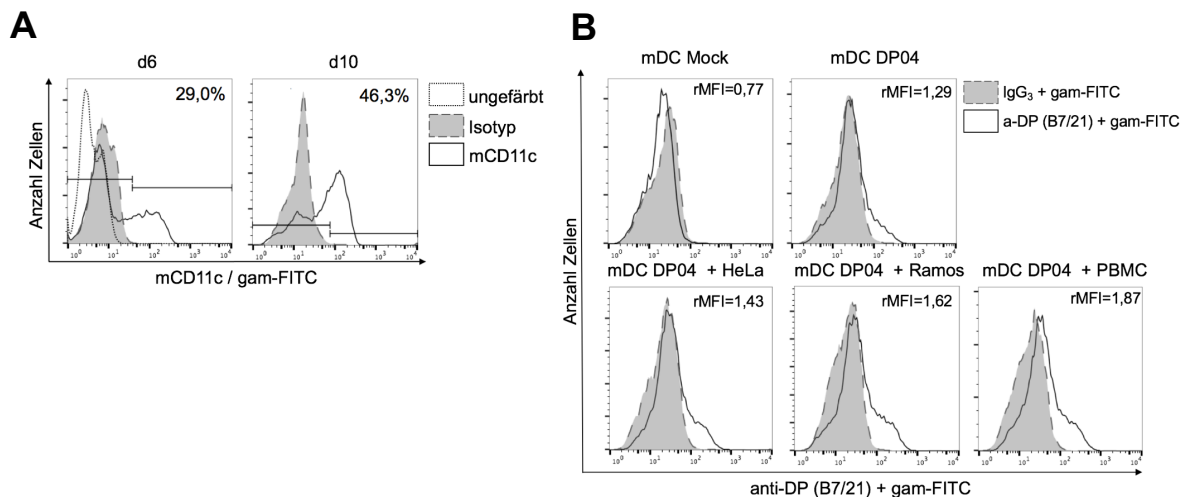
An Tag 10 der DC-Generierung wurden diese mit humanem HLA-DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 elektroporiert. Zusätzliche Populationen wurden nach der Elektroporation 14 Stunden lang in Medium mit Zelltrümmern humaner Zellen inkubiert, damit sie nach

## Ergebnisse

Einbringung des humanen HLA-DP humane Proteine aufnehmen und diese als Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dieser Ansatz sollte die Fragestellung lösen, ob murine Peptide die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> verändern. Die Zugabe der Zelltrümmer erfolgte in einer Dichte von einer zerstörten humanen Zelle pro muriner dendritischer Zelle. Die Erkennung der Zellen wurde im IFN- $\gamma$  ELISpot mit TZR<sub>11C12</sub> positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Die Positivkontrolle wurde durch die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL gestellt, die HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL diente wiederum als Negativkontrolle.

Durchflusszytometrisch ließ sich die Reinheit der murinen dendritischen Zellen an Tag 6 mit ungefähr 30% und an Tag 10 mit um die 50% messen (Abb. 15 A). Nach der Elektroporation der mRNA konnte die Überexpression des humanen HLA-DP auf allen dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15 B).

Im IFN- $\gamma$  ELISpot zeigte sich eine spezifische Erkennung der HLA-DP tragenden murinen dendritischen Zellen, während das Niveau der spezifischen Erkennung durch die Inkubation mit Zelllysat humaner Zellen nicht verändert wurde. Die unveränderten dendritischen Zellen zeigten keine Hintergrunderkennung durch TZR<sub>11C12</sub> oder Mock-transfizierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 15 C).



## Ergebnisse

### C

#### IFN- $\gamma$ Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 in murinen dendritischen Zellen

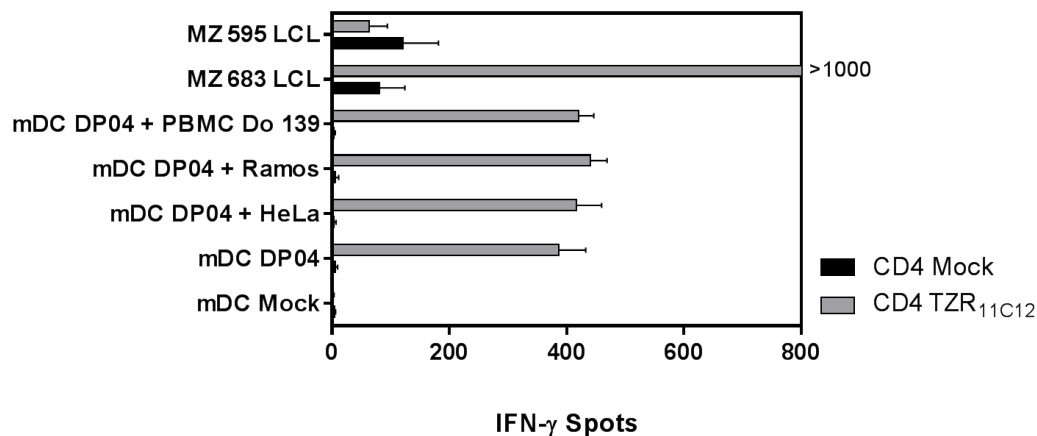


Abbildung 15: Test muriner dendritischer Zellen als Träger des HLA-DP

(A) An den Tagen 6 und 10 der GM-CSF Stimulation von murinem Knochenmark wurde die Reinheit der murinen dendritischen Zellen anhand der Expression von murinem CD11c überprüft, das mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers angefärbt wurde. (B) 14 Stunden nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 wurde die HLA-DP Expression mit Hilfe des Hybridantikörpers a-DP (B7/21) gemessen, der sekundär mit Hilfe von gam-FITC angefärbt wurde. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. DP04 steht für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Die Bezeichnungen HeLa, Ramos und PBMC stehen für das jeweilige Zelllysat, mit dem über Nacht inkubiert wurde. (C) Die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> wurde mit Hilfe des ELISpot durch eine 20 stündige Kokultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass humanes HLA-DPB1\*04:01 auf murinen dendritischen Zellen spezifisch erkannt wird. Dabei ist es irrelevant, ob vorher Zelllysat humaner Zellen inkubiert wurde. Das wirft die These auf, dass tumorspezifische Faktoren die Erkennung der Mauszelllinien in Kapitel 4.5 (Abb. 14) herabregulieren.

#### 4.7 Test der häufig vorkommenden HLA-DPB Allele

TZR<sub>11C12</sub> wurde aus leukämieaktiven T-Zellen isoliert, die HLA-DPB1\*04:01 positive Leukämieblasten erkennen (7). Da unklar war, was der TZR für eine Kreuzreaktivität gegenüber anderen HLA-DPB1 Allelen besitzt, wurden häufig in der kaukasischen Bevölkerung vorkommende HLA-DP Kettenpaare ausgewählt (151). Die Auswahl der HLA-DPB1 Allele ermöglichte eine Untersuchung von 87% der exprimierten HLA-DPB1 Allele in der kaukasischen Bevölkerung. Die ausgewählten Allele wurden zusammen mit den nach Hollenbach et al. (151) beschriebenen, physiologisch koexprimierten HLA-DPA1 Allelen in die HLA-DP negativen Zelllinien HeLa, Jurkat und K562 per Elektroporation eingebracht und deren Expression durchflusszytometrisch überprüft. TZR<sub>11C12</sub> exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden daraufhin im IFN- $\gamma$  Elispot mit den Zielzellen kokultiviert und die Sekretion von IFN- $\gamma$  nachgewiesen. Als Positivkontrolle

## Ergebnisse

diente wie bereits beschrieben die HLA-DPB1\*04:01 exprimierende MZ 683 LCL. Die MZ 595 LCL, die HLA-DPB1\*04:01 negativ ist, zeigt die Erkennung von EBV-Peptiden auf den LCL durch die T-Zellen.

Die Expression der HLA-DP Allele gelang auf allen untersuchten Zelllinien, wobei sich das Expressionsniveau der HLA-DP auf den verschiedenen Zelllinien und zwischen den HLA-DP Allelen unterschied (Tab. 7).

HLA-DPA1*-/DPB1*	K562 (rMFI)	HeLa (rMFI)	Jurkat (rMFI)
02:01/01:01	9,83	35,84	13,10
01:03/02:01	9,38	19,73	3,86
01:03/03:01	19,53	48,42	31,43
01:03/04:01	15,70	49,64	26,37
01:03/04:02	14,56	63,81	20,38
01:03/06:01	19,01	41,36	22,11
02:01/13:01	14,12	27,31	17,64
Mock	1,01	0,92	0,95

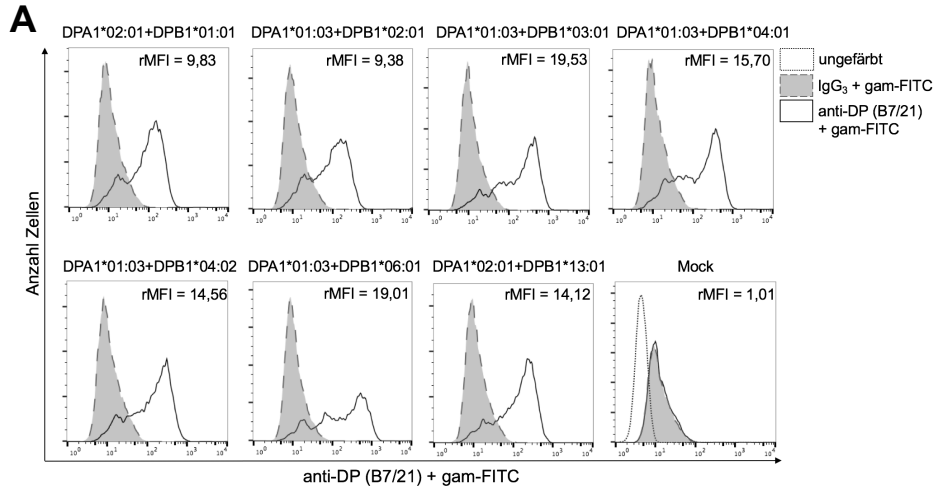
Tabelle 7: Expression verschiedener HLA-DP auf K562, HeLa und Jurkat

Aufgetragen sind die rMFI der elektroporierten HLA-DP Kettenpaarungen etwa 14 Stunden nach Elektroporation. Der rMFI ist der Quotient der Fluoreszenzintensität von anti-DP (B7/21) und Isotyp IgG<sub>3</sub>, die beide durch eine Sekundärfärbung mit gam-FITC nachgewiesen wurden.

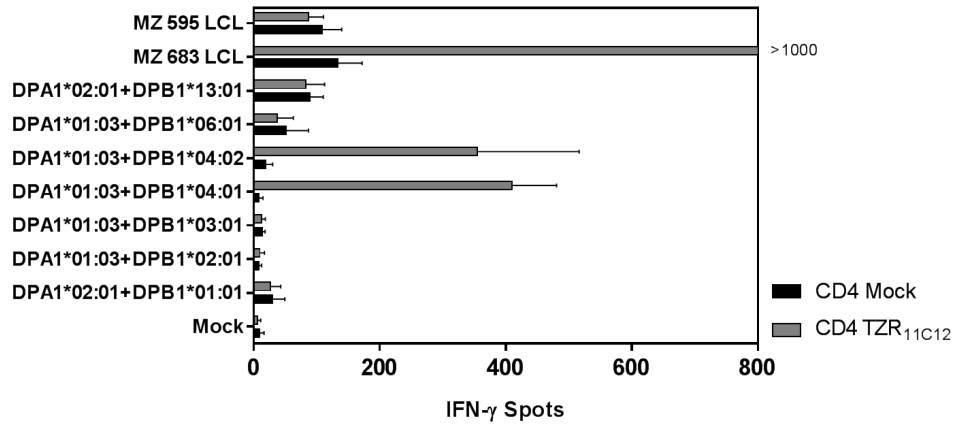
Im ELISpot zeigte sich eine sehr geringe Erkennung der Zelllinien ohne vorherige Veränderung. TZR<sub>11C12</sub> elektroporierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine spezifische IFN- $\gamma$  Sekretion gegenüber HLA-DPB1\*04:01 als auch -DPB1\*04:02 exprimierenden K562, HeLa und Jurkat Zellen (Abb. 16 B, C, D). HLA-DPB1\*04:02 wurde in Jurkat mit 260,83 (SD  $\pm$ 65,79) Spots etwas schlechter erkannt als HLA-DPB1\*04:01 mit 384,83 (SD  $\pm$ 49,14) Spots (Abb. 16 D). Die anderen getesteten Allele induzierten keine spezifische IFN- $\gamma$  Sekretion in TCR<sub>11C12</sub>-tragenden T-Zellen. Mock transfizierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten ebenfalls keine IFN- $\gamma$  Sekretion gegenüber den getesteten Zielzellen.

Die erkennbare Reaktivität gegenüber mit HLA-DPB1\*13:01 elektroporierten Zelllinien durch alle Spender war lediglich unspezifisch. (Abb. 16 B, C, D). Weitere Versuche mit den am häufigsten vorkommenden HLA-DPB1 Allelen (151) in HLA-DP negativen T2 Zellen (T-/B-Zell-Hybrid) und in der AML-Zelllinie KG-1 bestätigen diese Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

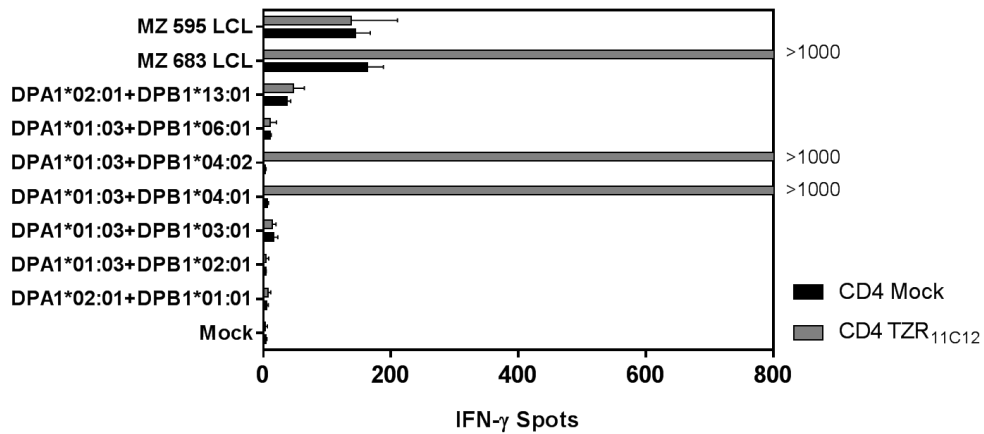
# Ergebnisse



**B** IFN- $\gamma$  Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber häufig vorkommenden HLA-DPB1 Allelen in K562



**C** IFN- $\gamma$  Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber häufig vorkommenden HLA-DPB1 Allelen in HeLa



## Ergebnisse

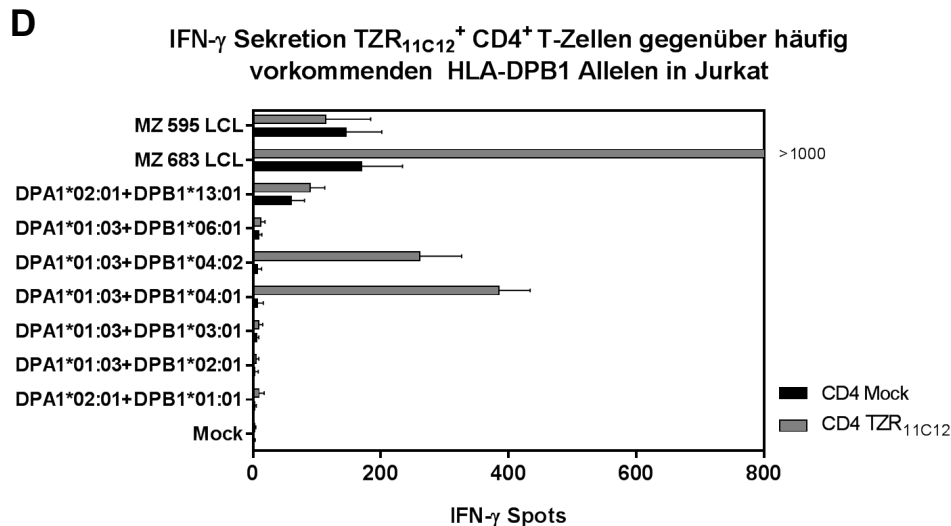


Abbildung 16: Test der in der kaukasischen Bevölkerung häufig vorkommenden HLA-DP

(A) Die HLA-DP Expression wurde 14 Stunden nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 durchflusszytometrisch mit Hilfe des Hybridomantikörpers  $\alpha$ -DP (B7/21) gemessen, der sekundär durch  $\gamma$ -FITC angefärbt wurde. Exemplarisch ist hier die Expression auf K562-Zellen dargestellt. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. (B) (C) (D) Die spezifische Erkennung durch CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> wurde mit Hilfe des IFN- $\gamma$  ELISpot in einer 20 stündigen Kokultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, die elektroporierten Kettenpaarungen sind jeweils für die Zellen aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Diese Daten veranschaulichen, dass nur die beiden Allele HLA-DPB1\*04:01 und das verwandte HLA-DPB1\*04:02 von TZR<sub>11C12</sub> spezifisch erkannt werden.

### 4.8 Test unterschiedlicher HLA-DP Kettenpaarungen

In epidemiologischen Studien zur allogenen Stammzelltransplantation konnte gezeigt werden, dass das Risiko transplantationsassoziiertter Komplikationen unabhängig von der  $\alpha$ -Kette des HLA-DP ist. Ein Mismatch der  $\alpha$ -Kette zeigte eine tendenzielle Reduktion der Rezidivwahrscheinlichkeit (185). Andere Studien zeigten außerdem, dass Polymorphismen der HLA-DP  $\alpha$ -Kette die Reaktivität von T-Zellen modulieren können (186). Der Polymorphismus der  $\alpha$ -Kette des HLA-DP ist in der kaukasischen Bevölkerung sehr klein, sodass HLA-DPA1\*02:01 und HLA-DPA1\*01:03 von fast 96% der Bevölkerung getragen werden (151).

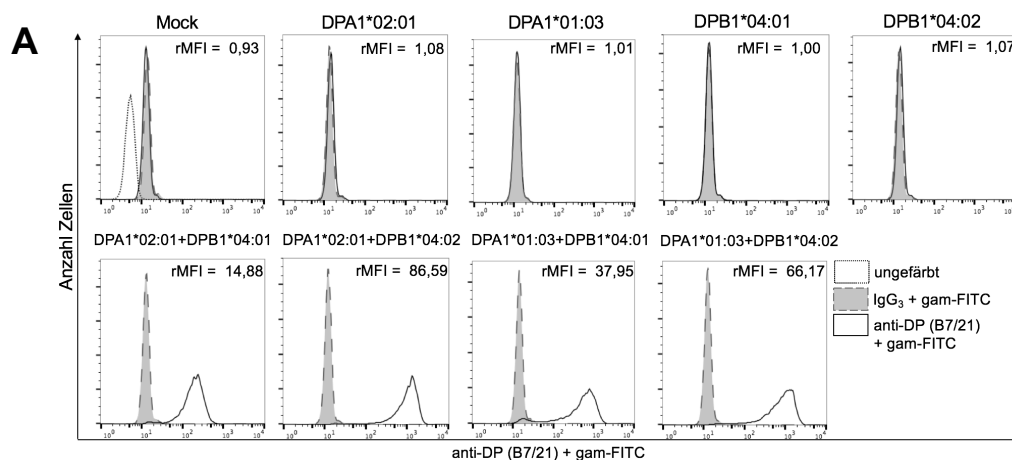
Um die Abhängigkeit der Erkennung von TZR<sub>11C12</sub> von der  $\alpha$ -Kette des HLA-DP Antigen zu messen, wurden verschiedene Kombinationen aus HLA-DPA1\*02:01 und – DPA1\*01:03 mit HLA-DPB1\*04:01 und –DPB1\*04:02 in K562, HeLa und Jurkat mittels RNA Elektroporation exprimiert und auf ihre spezifische Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Als Positivkontrolle diente die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL. Um die Erkennung von EBV-Peptiden auf den LCL

## Ergebnisse

durch die T-Zellen darzustellen, wurde die HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL getestet.

Für einzeln transfizierte HLA-DPA1 bzw. -DPB1 Ketten konnte weder eine Expression noch eine Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> gemessen werden (Abb. 17 A). Die Oberflächenexpression der Kettenpaarungen war nicht homogen für alle HLA-DPA1/DPB1 Heterodimere messbar. Die Expressionsdaten zeigen, dass die physiologisch nicht vorkommende Kettenpaarung HLA-DPA1\*02:01 + HLA-DPB1\*04:01 (151) in allen drei Zelllinien am schlechtesten exprimiert wurde. In HeLa-Zellen konnte die höchste Expression erzielt werden (Tab. 8).

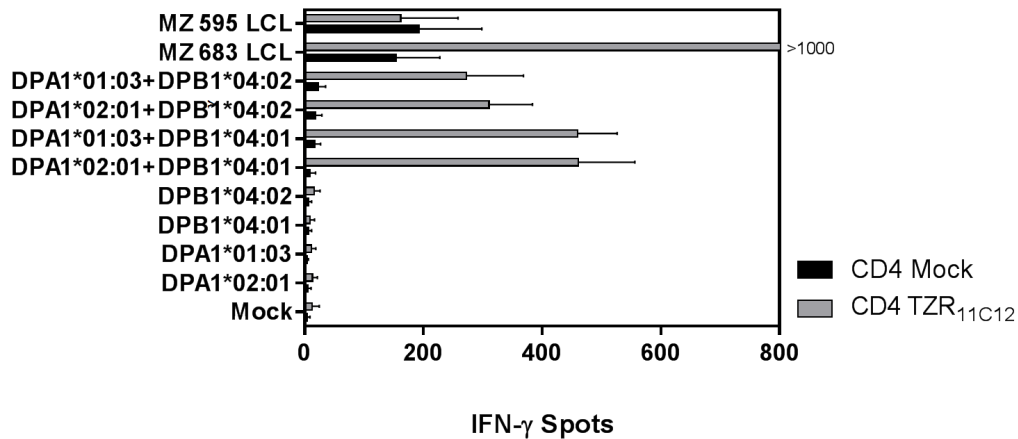
Im IFN- $\gamma$  ELISpot zeigte sich für alle eingebrachten HLA-DPA/DPB Kettenpaarungen eine deutliche Erkennung (Abb. 17 B, C, D, Tab. 9). In K562 konnte, in Analogie zu den Ergebnissen von Kapitel 4.7, eine bessere Erkennung der Kettenpaarungen mit HLA-DPB1\*04:01 nachgewiesen werden. Die Erkennung der Paare erfolgte unabhängig vom koexprimierten HLA-DPA1 Allel (Abb. 17 B, Tab. 9). In HeLa wurden alle Kettenpaarungen mit HLA-DPA1\*01:03 besser erkannt als Paare mit HLA-DPA1\*02:01 (Abb. 17 C, Tab. 9) was durch eine bessere Expression (Faktor 2) von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 im Vergleich zu HLA-DPA1\*02:01/-DPB1\*04:01 erklärt werden kann. Kettenpaarungen mit HLA-DPB1\*04:02 wurden in HeLa-Zellen ebenfalls spezifisch von TZR<sub>11C12</sub> erkannt. Auch in Jurkat-Zellen wurden alle Haplotypen erkannt. Die nicht physiologisch vorkommende Kettenpaarung aus HLA-DPA1\*02:01/-DPB1\*04:01 wurde aufgrund des geringen Expressionsniveaus schlechter erkannt als die anderen Kettenpaarungen (Abb. 17 D, Tab. 9) und seine Expression war um den Faktor 6 geringer als die von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 (Tab. 8).



## Ergebnisse

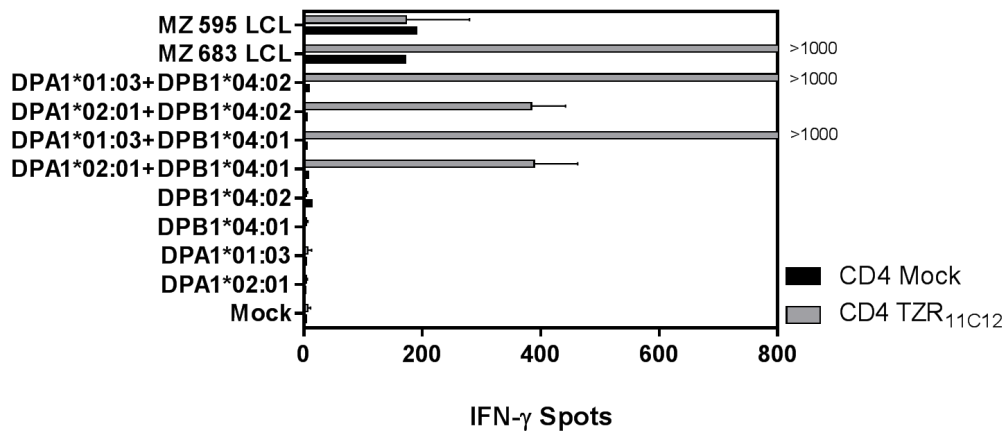
### B

#### IFN- $\gamma$ Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber unterschiedlichen HLA-DP Kettenpaarungen in K562



### C

#### IFN- $\gamma$ Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber unterschiedlichen HLA-DP Kettenpaarungen in HeLa



### D

#### IFN- $\gamma$ Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber unterschiedlichen HLA-DP Kettenpaarungen in Jurkat

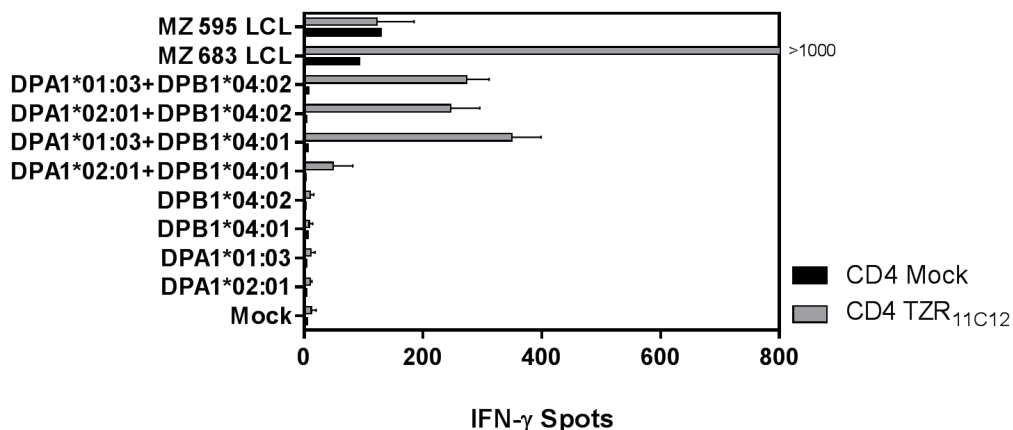


Abbildung 17: Test unterschiedlicher HLA-DPA/-DPB Kettenpaarungen

(A) 14 Stunden nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 wurde die HLA-DP Expression auf den Zielzellen mit Hilfe des Hybridomantikörpers  $\alpha$ -DP (B7/21) gemessen, der sekundär mit Hilfe von  $\gamma$ m-FITC angefärbt wurde. Hier ist exemplarisch die Expression auf HeLa-Zellen dargestellt. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. (B) (C) (D) Die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> wurde mit Hilfe des ELISpot durch eine 20 stündige Kokultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, eingebrachte Kettenpaarungen sind für jede Zelle

## Ergebnisse

entsprechend aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

<b>Expressionsanalyse unterschiedlicher HLA-DP Kettenpaarungen</b>	<b>HLA-DPA1*02:01 + HLA-DPB1*04:01</b>	<b>HLA-DPA1*02:01 + HLA-DPB1*04:02</b>	<b>HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*04:01</b>	<b>HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*04:02</b>
<b>K562</b>	3,55	5,77	11,18	13,28
<b>HeLa</b>	14,88	86,59	37,95	66,17
<b>Jurkat</b>	2,34	9,10	14,78	16,06

Tabelle 8: **Expressionsanalyse der unterschiedlichen HLA-DP Kettenpaarungen in K562, HeLa und Jurkat**

Aufgetragen sind die exprimierten Kettenpaarungen in einer Übersicht, die das Expressionsniveau der einmaligen Messungen 14 Stunden nach Elektroporation zeigt. Die rMFI wurde als Quotient der Fluoreszenzintensität aus anti-DP (B7/21) und Isotyp IgG<sub>3</sub>, beide + gam-FITC errechnet.

<b>Erkennung der unterschiedlichen Kettenpaarungen im ELISpot</b>	<b>HLA-DPA1*02:01 + HLA-DPB1*04:01</b>	<b>HLA-DPA1*02:01 + HLA-DPB1*04:02</b>	<b>HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*04:01</b>	<b>HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*04:02</b>
<b>K562</b>	460,67±95,52	310,67±73,05	459,83±66,51	272,17±96,31
<b>HeLa</b>	389,00±73,57	384,17±57,74	>1000	>1000
<b>Jurkat</b>	48,67±33,20	246,50±49,12	349,50±49,23	274,00±37,54

Tabelle 9: **Übersicht der Erkennung der HLA-DP Kettenpaarungen durch CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub> im ELISpot**

Gezeigt sind jeweils die Werte für den Mittelwert ± Standardabweichung der Anzahl der IFN- $\gamma$  Spots im Elispot der drei verwendeten CD4<sup>+</sup> Donoren mit TZR<sub>11C12</sub>. >1000 Spots/w bedeutet, dass das well komplett gefüllt war.

Durch diesen Versuch wird deutlich, dass TZR<sub>11C12</sub> seine Zielstruktur unabhängig von der koexprimierten  $\alpha$ -Kette des HLA-DP erkennt. Die spezifische Zielstruktur des TZR liegt somit auf der  $\beta$ -Kette von HLA-DPB1\*04:01 oder von HLA-DPB1\*04:02 oder besteht aus dem Komplex der  $\beta$ -Kette mit beladenem Peptid. In Analogie zu den Versuchen mit häufig vorkommenden HLA-DP Kettenpaarungen induzierte HLA-DPB1\*04:01 erneut eine stärkere T-Zell Aktivierung als HLA-DPB1\*04:02.

### 4.9 Test verschiedener Kombinationen des T-Zell Rezeptors

Um zu prüfen, ob die HLA-DPB1\*04:01 Spezifität von TZR<sub>11C12</sub> von der Expression des TZR-Heterodimers abhängig ist oder lediglich durch eine der beiden TZR-Ketten hervorgerufen wird, wurden die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette des TZR<sub>11C12</sub> einzeln und als Heterodimer mit irrelevanten TZR-Ketten in CD4<sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Donoren exprimiert. Als irrelevante Ketten dienten  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten des TZR<sub>2C4</sub>, der das HLA-DPB1\*14:01-Allel spezifisch erkennt. Der Nachweis der Erkennung durch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte im IFN- $\gamma$  ELISpot. Als Zielzellen dienten die HLA-DPB1\*105:01 positive AML-Zelllinie KG-1 und die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL. HLA-DPB1\*105:01

## Ergebnisse

ist dem HLA-DPB1\*04:01 sehr ähnlich, sodass beide Zellen als Positivkontrolle fungierten. Die HLA-negative CML-Zelllinie K562 und die HLA-DPB1\*03:01 exprimierende MZ 595 LCL dienten als Negativkontrolle.

Zur Färbung der  $\beta$ -Kette von TZR<sub>2C4</sub> wurde ein Antikörper gegen V $\beta$  13.6 angewandt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von TZR<sub>11C12</sub> auch Fehlpaarungen mit Ketten von TZR<sub>2C4</sub> als auch mit endogenen Rezeptorketten eingehen können (Abb. 18 A). Die Erkennung der Zielzellen im IFN- $\gamma$  ELISpot erfolgte lediglich dann, wenn sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Kette von TZR<sub>11C12</sub> auf der Oberfläche der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wurde. Alle anderen eingebrachten Paarungen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette erzeugten keine Erkennung der beiden positiven Targets KG-1 und MZ 683 LCL (Abb. 18 B).

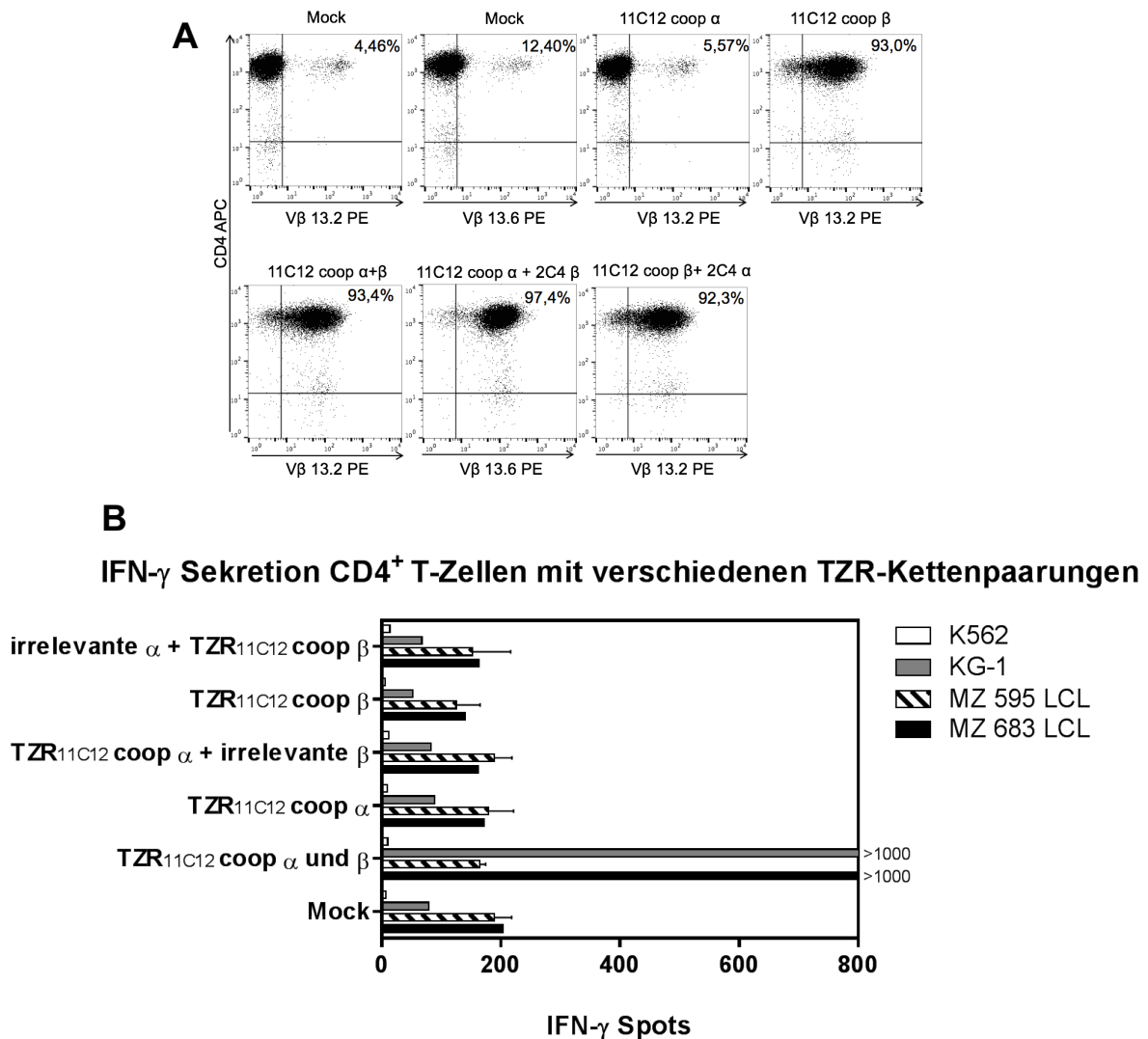


Abbildung 18: Test unterschiedlicher TZR-Kettenpaarungen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

(A) Gezeigt ist exemplarisch die Expression verschiedener TZR-Ketten-Kombinationen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines Donors 14 Stunden nach Elektroporation ohne (Mock) bzw. mit angegebener TZR-RNA. Zur Expressionsanalyse ist eine Färbung mit den TZR-Subfamilien-spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb) V $\beta$  13.2- bzw. V $\beta$  13.6-PE sowie einem CD3-spezifischen mAb erfolgt. (B) Die spezifische Erkennung verschiedener Zelllinien durch CD4<sup>+</sup>

## Ergebnisse

T-Zellen mit unterschiedlichen TZR-Kettenpaarungen wurde mit Hilfe des IFN- $\gamma$  ELISpot in einer 20 stündigen Ko-kultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Der TZR<sub>11C12</sub> benötigt somit für seine spezifische Erkennung von HLA-DPB1\*04:01 und HLA-DPB1\*105.01 sowohl die  $\alpha$ - als auch  $\beta$ - Kette des Rezeptors.

### 4.10 Test der Alloreaktion von TZR<sub>11C12</sub> gegen typische GvHD-Zielstrukturen

Eine wesentliche Komplikation nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist die Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Bei dieser kommt es durch T-Zellen des Spenders zur Erkennung von inkompatiblen HLA-Molekülen und „*minor*“ *histocompatibility antigens* auf den Empfängerzellen. Von dieser Form der immunologischen Reaktion sind vor allem Haut, Darm und Leber betroffen, wobei sich das Überleben der Patienten/-innen nach dem Auftreten dieser Erkrankung deutlich verschlechtert (44). Klinische Studien der Graft-versus-Host Reaktion zeigten, dass das HLA-DP als Zielstruktur fungieren kann (5,187).

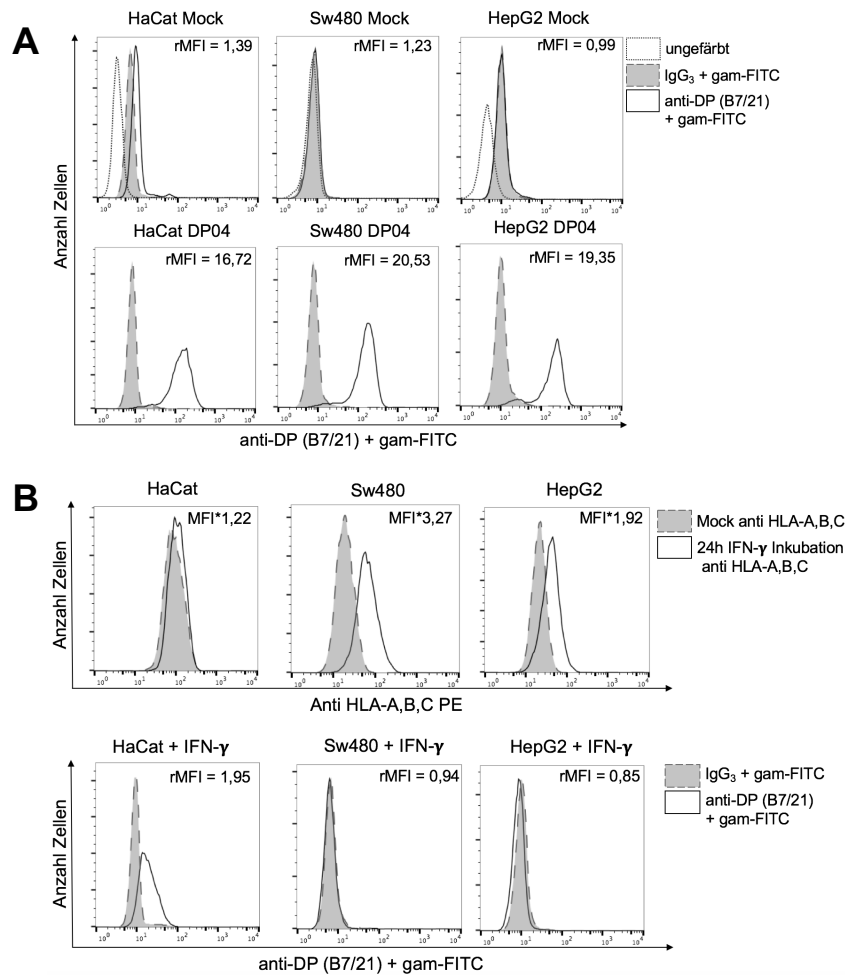
Um das Sicherheitsprofil von TZR<sub>11C12</sub> exprimierenden T-Zellen zu überprüfen, wurden die drei HLA-DPB1\*04:01<sup>+</sup> GvH-Modellzelllinien HaCat für die Haut, Sw480 für den Darm und HepG2 für die Leber verwendet. Die Zellen wurden ohne Veränderung, mit exogen eingebrachtem HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 und in inflammatorischer Umgebung getestet, die durch eine 24 Stunden dauernde Inkubation mit 500 IU/ml IFN- $\gamma$  erzeugt wurde. Als Positivkontrolle diente die HLA-DPB1\*04:01 positive MZ 683 LCL, als Negativkontrolle wurden HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL Zellen eingesetzt. HepG2 und Sw480 zeigten ohne zusätzliche Einbringung der DP-Ketten keine HLA-DP Expression. Lediglich auf HaCat-Zellen band der anti-DP (B7/21) - Antikörper. Die Induktion der HLA-DP Expression durch Elektroporation von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 gelang in allen drei Zelllinien (Abb. 19 A).

Nach der 24-stündigen IFN- $\gamma$  Inkubation der drei Zelllinien konnte nur in HaCat eine Steigerung der HLA-DP Expression gemessen werden. In den anderen beiden Zelllinien blieb eine Steigerung der Expression aus (Abb. 19 B). Um die Effektivität der IFN- $\gamma$  Inkubation zu überprüfen, erfolgte über die Färbung der Proben mit anti-HLA-A,B,C PE. In den drei geprüften Zelllinien konnten Steigerungen in der HLA-Expression gemessen werden (Abb. 19 B).

Unverändert wurden die Zellen durch TZR<sub>11C12</sub> nicht erkannt. Nach der Elektroporation konnte, in Analogie zu den vorherigen Versuchen mit elektroporierten Zelllinien, bei

## Ergebnisse

den drei getesteten Zelllinien eine spezifische Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> nachgewiesen werden (Abb. 19 C), wohingegen nach der IFN- $\gamma$  Inkubation nur HaCat erkannt wurden. Die anderen beiden Zelllinien zeigten weder eine Hochregulation der HLA-DP Expression (Abb. 19 B) noch eine spezifische Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> im inflammatorischen Milieu (Abb. 19 C). Durch unveränderte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Mock) fand keine Erkennung statt.



## Ergebnisse

### C

#### IFN- $\gamma$ Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den GvHD-Modellzelllinien HaCat, Sw480 und HepG2

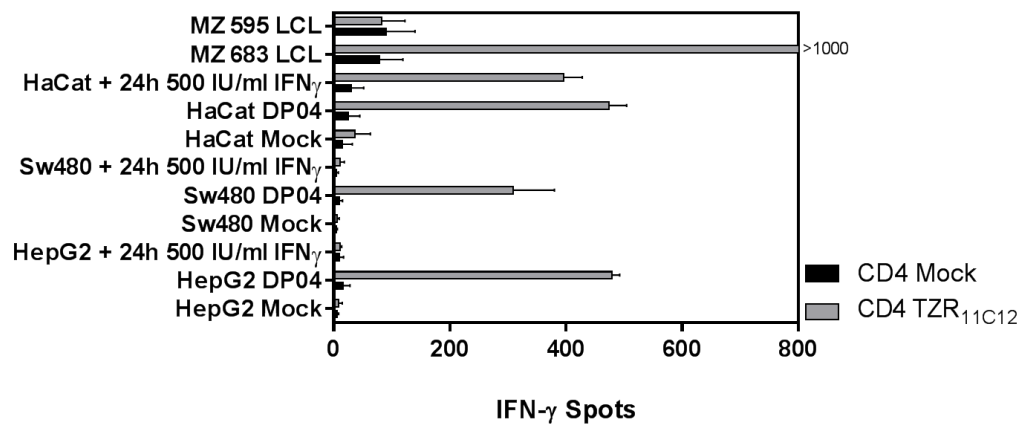


Abbildung 19: Testung der GvHD-Modellzelllinien ohne RNA, mit RNA elektroporiert und nach IFN- $\gamma$  Inkubation

(A) Im Verlauf nach Elektroporation mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 wurde dessen Expression auf den Zielzellen mit Hilfe des Hybridomantikörpers a-DP B7/21 gemessen, der sekundär mit Hilfe von gam-FITC angefärbt wurde. Als Isotypkontrolle diente IgG<sub>3</sub>. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. DP04 steht für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen (B) In diesem Diagramm ist die Expression von HLA-A,B,C und HLA-DP nach einer 24-stündigen Inkubation mit IFN- $\gamma$  aufgetragen. Die angegebene Steigerung des MFI wurde als Faktor zwischen dem MFI der jeweiligen Zellen ohne und nach 24-stündiger IFN- $\gamma$  Inkubation berechnet. (C) Die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> wurde mit Hilfe des ELISpot nach einer 20 stündigen Kokultur mit einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Rezeptor keine unspezifischen Antigene auf der Oberfläche der GvH-Modellzelllinien erkannt hat. Die HLA-DPB1\*04:01 exprimierenden Zellen nach Elektroporation zeigten dagegen alle eine Erkennung durch den TZR<sub>11C12</sub>. In der nachgestellten Inflammationssituation konnte eine Reaktivität gegen HaCat-Zellen nachgewiesen werden, sodass die Gefahr einer GvHD durch TZR<sub>11C12</sub> nicht außer Acht gelassen werden darf.

#### 4.11 Test artifizieller HLA-DP Tetramere auf Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub>

Die bereits durchgeführten Versuche zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von TZR<sub>11C12</sub> deckten bislang nur zellbasierte Systeme ab. Es ist damit unklar, inwieweit zelluläre Kofaktoren eine Rolle bei der Bindung des Antigens spielen und ob die Erkennung des HLA-DPB1\*04:01 vollständig vom beladenen Peptid unabhängig ist. Zur Klärung dieses Sachverhaltes dienen zwei unterschiedliche Tetramere, die dankenswerterweise von Professor Pedro Romero vom Ludwig Center of Cancer Research des Universitätsklinikums Lausanne bereitgestellt wurden.

## Ergebnisse

Bei diesen Strukturen handelt es sich um extrazellulär stabile Konstrukte aus jeweils vier HLA-DPA1\*01:03 und vier HLA-DPB1\*04:01. Diese enthalten ein definiertes Peptid in ihrer Bindetasche (188). Im Fall der beiden getesteten Tetramere handelt es sich um die Peptide MAGE-A3<sub>243-258</sub> (Peptid-Sequenz: KKLLTQHFVQENYLEY) und Tetanustoxoid<sub>111-125</sub> (Peptid-Sequenz: RKVAELVHFLLLKYR) (189). Zur Stabilisation der HLA-DP Struktur enthalten die Proteine jeweils ein biotinyliertes Ende, das über Streptavidin gebunden wird und damit die vier HLA-DP in ihrer Struktur hält. Zum durchflusszytometrischen Nachweis sind die Tetramere mit PE markiert (188).

Die Analyse der gewonnenen Daten zeigte keine spezifische Bindung weder der MAGE-A3 noch der Tetanustoxoid-Tetramere an CD4<sup>+</sup> T-Zellen dreier PBMC-Donoren mit TZR<sub>11C12</sub> (Abb. 20).

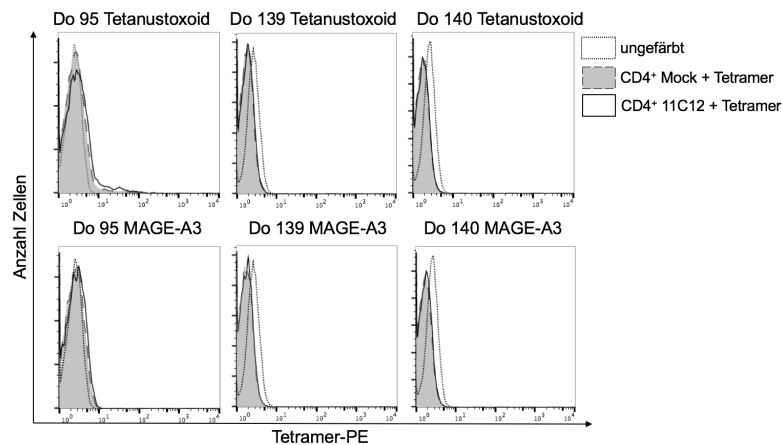


Abbildung 20: **Durchflusszytometrische Analyse der Tetramerbindung an CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub>**

Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit nachgewiesener Expression des TZR<sub>11C12</sub> nach 1-stündiger Bindungsreaktion. Tetanustoxoid steht für die Binderaktion mit den Tetramer, auf dem das Peptid Tetanustoxoid<sub>111-125</sub> beladen ist, MAGE-A3 für die Bindereaktion mit dem Tetramer, auf dem das Peptid MAGE-A3<sub>243-258</sub> beladen ist.

Das bedeutet, dass die Bindung des TZR an HLA von Faktoren beeinflusst wird, die sich auf oder in den erkannten Zellen befinden. Alternativ könnte die Affinität von TZR<sub>11C12</sub> gegenüber HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 trotz der korezeptorunabhängigen Bindung der Zielstruktur zu wenig affin sein, um die Tetramere zu binden.

### 4.12 Prüfung der Erkennung spezifisch beladener Peptide durch TZR<sub>11C12</sub>

Durch die Testung unterschiedlicher Zelllinien als Träger des HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 als Ziel von TZR<sub>11C12</sub> konnte ein großes Peptidspektrum abgedeckt werden (Siehe Kapitel 4.3, 4.5). Allerdings bleibt bei diesen Ergebnissen unklar, welche Peptide aus dem Proteom der Zellen wirklich auf das eingebrachte HLA-DP geladen

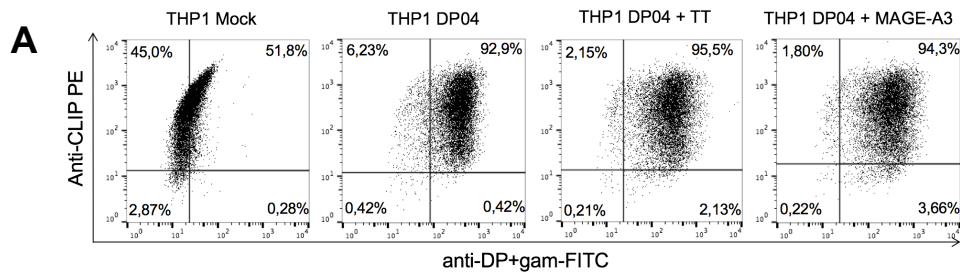
## Ergebnisse

werden. Um definierte Peptide auf HLA-DP positive Zellen zu laden, wurde eine Peptidinkubation durchgeführt. Für diese Versuche wurden die beiden bekannten HLA-DP04-bindenden Peptide MAGE-A3<sub>243-258</sub> (KKLLTQHFVQENYLEY) (190) und Tetanustoxoid<sub>111-125</sub> (RKVAELVHFLLLKYR) (189) für 4 Stunden mit einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 positiven Zellen inkubiert. Es handelt sich dabei um die gleichen Peptide wie diejenigen, die sich auf den Tetrameren befinden (siehe Kapitel 4.11). Die Peptide sind mit  $IC_{50}$ -Werten von 37,4 nM für MAGE-A3-Peptid und 15,5 nM für das Tetanustoxoidpeptid starke Bindungsagonisten an HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 (191,192).

Als Zielzellen wurden THP-1 und EL-4 ausgewählt. THP-1, die aufgrund eines HLA-Klasse II Beladungsdefektes das Platzhalterpeptid CLIP auf den HLA-Klasse II an ihrer Zelloberfläche tragen (101), sollten eine leichte Beladung durch eine Verdrängung des CLIP ermöglichen. EL-4 wurden ausgewählt, um den Effekt spezifischer Mauspeptide auf exogen eingebrachten humanen HLA-DP zu untersuchen. Diese sollten durch die Beladung mit Hilfe der Peptide verdrängt werden. Der Nachweis der Peptidbeladung sollte für THP-1 durchflusszytometrisch durch die Messung der CLIP-Expression an ihrer Oberfläche erfolgen. HLA-DPA1\*01:03/ -DPB1\*04:01 konnte in alle Zielzellen eingebracht werden. Die CLIP-Expression auf den THP-1-Zellen veränderte sich durch die Peptidinkubation nicht wesentlich (Abb. 21 A, Tab. 10).

In Analogie zum Versuch mit den Tierzelllinien in Kapitel 4.5 wurden EL-4 von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit TZR<sub>11C12</sub> im ELISpot nicht erkannt (Abb. 21 B). THP-1 zeigten dagegen eine Erkennung mit 326,33 (SD  $\pm$ 106,26) Spots, wenn sie mit HLA-DPA1\*01:03/ -HLA-DPB1\*04:01 elektroporiert wurden. Nach der Elektroporation und der Peptidbeladung wurden die Zellen mit 280,67 (SD  $\pm$ 126,84) Spots für das Tetanustoxoid-Peptid und 311,33 (SD  $\pm$ 138,10) Spots für das MAGE-A3 Peptid erkannt (Abb. 21 B). Die HLA-DPB1\*04:01 exprimierende Positivkontrolle wurde durch den TZR<sub>11C12</sub> spezifisch erkannt. Um die Hintergrunderkennung der EBV-Peptide auf den LCL durch die T-Zellen darzustellen, wurde die HLA-DPB1\*04:01 negative MZ 595 LCL getestet.

## Ergebnisse



## B

**IFN- $\gamma$  Sekretion TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den exogen beladenen Peptiden TT<sub>111-125</sub> und MAGE-A3<sub>243-258</sub> auf HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 in EL-4 und THP-1**

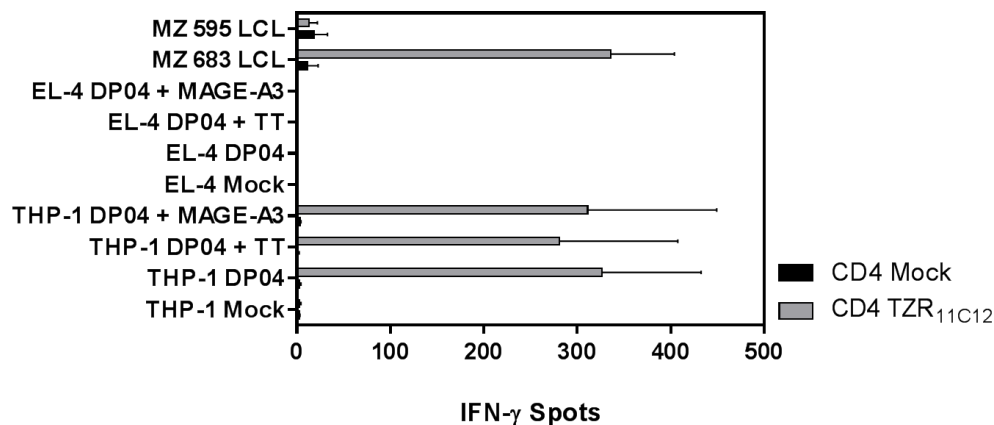


Abbildung 21: Test der peptidbeladenen THP-1 und EL-4

(A) 14 Stunden nach Elektroporation wurde die Expression von HLA-DP auf Zellen gemessen. DP04 steht für die mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen, Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. TT steht für 4 Stunden mit Tetanustoxoid<sub>111-125</sub> inkubierte Zellen. MAGE-A3 steht für 4 Stunden mit MAGE-A3<sub>243-258</sub> inkubierte Zellen. (B) Die spezifische Erkennung wurde über die IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> Mock und TZR<sub>11C12</sub> mit Hilfe des ELISpot durch eine 20 stündige Kokultur bei einer T-Zell zu Zielzellrate von 0,6:1 (30.000:50.000) bestimmt. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen, DP04 für mit HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 elektroporierte Zellen. TT steht für mit HLA-DP elektroporierte und vier Stunden mit dem Peptid Tetanustoxoid<sub>111-125</sub> inkubierte Zellen. MAGE-A3 steht für mit HLA-DP elektroporierte und vier Stunden mit dem Peptid MAGE-A3<sub>243-358</sub> inkubierte Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von drei T-Zell-Spendern (jeweils Doppelwerte) + Standardabweichung

Verdrängung des CLIP auf THP-1	THP-1 Mock	THP-1 DP04	THP-1 DP04 + TT	THP-1 DP04 + MAGE-A3
rMFI	52,88 (SD $\pm$ 12,70)	57,86 (SD $\pm$ 16,23)	49,51 (SD $\pm$ 14,24) <sup>1</sup>	75,60 (SD $\pm$ 30,42) <sup>1</sup>

Tabelle 10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der CLIP-Expression auf THP-1

Aufgetragen sind die rMFI des PE-Kanals der Messung von ca. 15000 Zellen mit anti-CLIP PE. Die rMFI wurde als Quotient aus dem MFI des PE-Kanals von anti-CLIP PE zur Isotypenkontrolle REA-Control PE berechnet. 1) Für die Peptidinkubation sind jeweils nur zwei Werte verfügbar.

Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, dass THP-1 nach einer Peptidbelastung ihr CLIP auf der Oberfläche behalten. Die Erkennung im IFN- $\gamma$  ELISpot änderte sich durch die Inkubation der Zellen mit spezifischen Peptiden nicht.

### 5 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie kann trotz intensiver Therapieschemata nur bei 40% der Erkrankten geheilt werden (10). Ein Hauptproblem der Therapie bleibt der Krankheitsrückfall der Leukämie (122), sodass effektive Strategien zu dessen Verhinderung notwendig sind. Nach der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation geht von den T-Zellen des Spenders nicht nur ein Risiko für die GvHD aus, diese können auch im Rahmen des Graft versus Leukemia (GvL) Effektes verbleibende Leukämieblasten zerstören (63). Klinische Studien zeigten, dass sich bei Vorliegen eines HLA-DP-Mismatches bei sonst passenden HLA-Allelen die Rückfallwahrscheinlichkeit einer Leukämie signifikant verringert (4). Deswegen wird vermutet, dass HLA-DP ein Graft-versus-Leukemia Antigen darstellt. Außerhalb von inflammatorischen Situationen ist die Expression von HLA-Klasse II fast ausschließlich auf hämatopoetische und lymphatische Zellen beschränkt, was einen selektiven, durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelten, GvL-Effekt ermöglicht. Daher wurden allogene CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Spender T-Zellen gegen primäre Leukämieblasten im HLA-DP Mismatch stimuliert (7). Aus einem dabei entstandenen Klon wurde der TZR<sub>11C12</sub> isoliert, der in diesem Projekt funktionell charakterisiert wurde.

#### 5.1 HLA-DPB1\*04:01-Spezifität von TZR<sub>11C12</sub>

Damit das von TZR<sub>11C12</sub> erkannte Epitop näher betrachtet werden kann, muss das HLA-DP ausgehend von seiner Primärstruktur untersucht werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Allele zeigt, dass keine große Heterogenität des HLA-DP Genlocus in der Bevölkerung vorliegt (151). Dabei scheinen vor allem die auf Exon 2 des HLA-DPB liegenden Polymorphismen eine Rolle für die Alloreaktivität zu spielen (186,193,194). Die Sequenzanalyse dieses Exons zeigte sechs für die Alloreaktivität relevante hypervariable Domänen (zwischen Allelen unterschiedliche Regionen), die an der Bildung der Peptidbindetasche beteiligt sind (186,194,195). Wie experimentell gezeigt wurde, scheint das HLA-DPA für die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> nicht wichtig, sodass die Zielstruktur vom TZR auf der  $\beta$ -Kette von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 oder im Komplex aus  $\beta$ -Kette und Peptid liegt.

## Diskussion

Allel	A (AS 8-11)	B (AS 33-36)	C (AS 55-57)	D (AS 65-67)	E (AS 76)	F (AS 84-87)
HLA-DPB1*01:01	VYQQ	EEYA	AAE	ILE	V	DEAV
HLA-DPB1*02:01	LFQQ	EEFV	DEE	ILE	M	GGPM
HLA-DPB1*03:01	VYQL	EEFV	DED	LLE	V	DEAV
<b>HLA-DPB1*04:01</b>	<b>LFQQ</b>	<b>EEFA</b>	<b>AAE</b>	<b>ILE</b>	<b>M</b>	<b>GGPM</b>
HLA-DPB1*04:02	LFQQ	EEFV	DEE	ILE	M	GGPM
HLA-DPB1*06:01	VYQL	EEFV	DED	LLE	M	DEAV
HLA-DPB1*13:01	VYQL	EEYA	AAE	ILE	I	DEAV
HLA-DPB1*105:01	LFQQ	EEFV	DEE	ILE	M	GGPM

Tabelle 11: Sequenzunterschiede der relevanten hypervariablen Domänen des HLA-DP

Aufgetragen sind die ermittelten Unterschiede der Primärstrukturen der Proteine an den hypervariablen Domänen von Exon 2 nach Cesbron et al (194). HLA-DPB1\*04:01 stellt die Referenzstruktur dar und ist gelb markiert. Die Unterschiede der anderen getesteten Allele zu HLA-DPB1\*04:01 sind fett dargestellt. Die Spalten kennzeichnen die jeweilige hypervariable Domäne (Abb. 22). Die grau geschriebenen Allele wurden im ELISpot nicht erkannt.

Die für die Alloreaktion relevanten hypervariablen Domänen auf Exon 2 des HLA-DPB1 unterscheiden sich innerhalb der Gruppe der geprüften HLA-DPB (Tab. 11). TZR<sub>11C12</sub> toleriert lediglich Polymorphismen der Domänen B (AS 33-36) und C (AS 55-57) (Tab. 11). HLA-DPB1\*04:02 und HLA-DPB1\*105:01 unterscheiden sich durch drei Aminosäuren in diesen Loci von HLA-DPB1\*04:01 und werden tendenziell etwas schlechter erkannt. Alle anderen nicht erkannten Allele tragen mindestens 10 unterschiedliche Aminosäuren in ihrer Primärstruktur bei deutlichen Unterschieden der hypervariablen Domänen (Tab. 11), was die ausbleibende Erkennung erklärt.

Allerdings wird die Erkennung nicht ausschließlich durch das Motiv der hypervariablen Domänen verändert. HLA-DPB1\*02:01 trägt, verglichen mit HLA-DPB1\*04:02, an Stelle 69 eine Glutaminsäure anstatt eines Lysins (E69K), während die hypervariablen Domänen auf Exon 2 identisch sind. Dieser Polymorphismus reicht, um die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> zu unterbinden.

Die von Zino et al. (148,195) vorgeschlagene und von Crocchiolo et al. (147) verfeinerte Einteilung der T-Zell Epitope (TCE) beschreibt die Immunogenität verschiedener HLA-DP gegenüber alloreaktiven T-Zellen (147,148,195). Der hier untersuchte TZR<sub>11C12</sub> erkennt nicht einheitlich eine TCE-Gruppe, sodass diese Einteilung keine Erklärung für das erkannte Motiv abgeben kann. Crivello et al. konnten in Untersuchungen von HLA-DPB1\*09:01 reaktiven T-Zell Klonen Mutationen identifizieren, die die Alloreaktion deutlich verringern (196). TZR<sub>11C12</sub> weist hinsichtlich dieser Veränderungen ein ähnliches Verhalten auf. Die Polymorphismen E69K und D84G (196) verän-

## Diskussion

dem ebenfalls die Erkennung des HLA-DPB1\*04:01 durch TZR<sub>11C12</sub>. Andere Aminosäuresubstitutionen wie F35Y und L11G (196), die für die Senkung der Erkennung von HLA-DPB1\*09:01 aufgefallen sind, konnten für TZR<sub>11C12</sub> nicht nachvollzogen werden. Die getesteten Allele mit diesen Substitutionen sind im Vergleich zu HLA-DPB1\*04:01 zu unterschiedlich, sodass bereits das die fehlende Erkennung erklärt. Rutten et al. konnten in Versuchen mit HLA-DPB1 spezifischen T-Zell Populationen eine Kreuzreaktivität gegenüber HLA-DPB1\*04:01 und –DPB1\*04:02 beobachten (6).

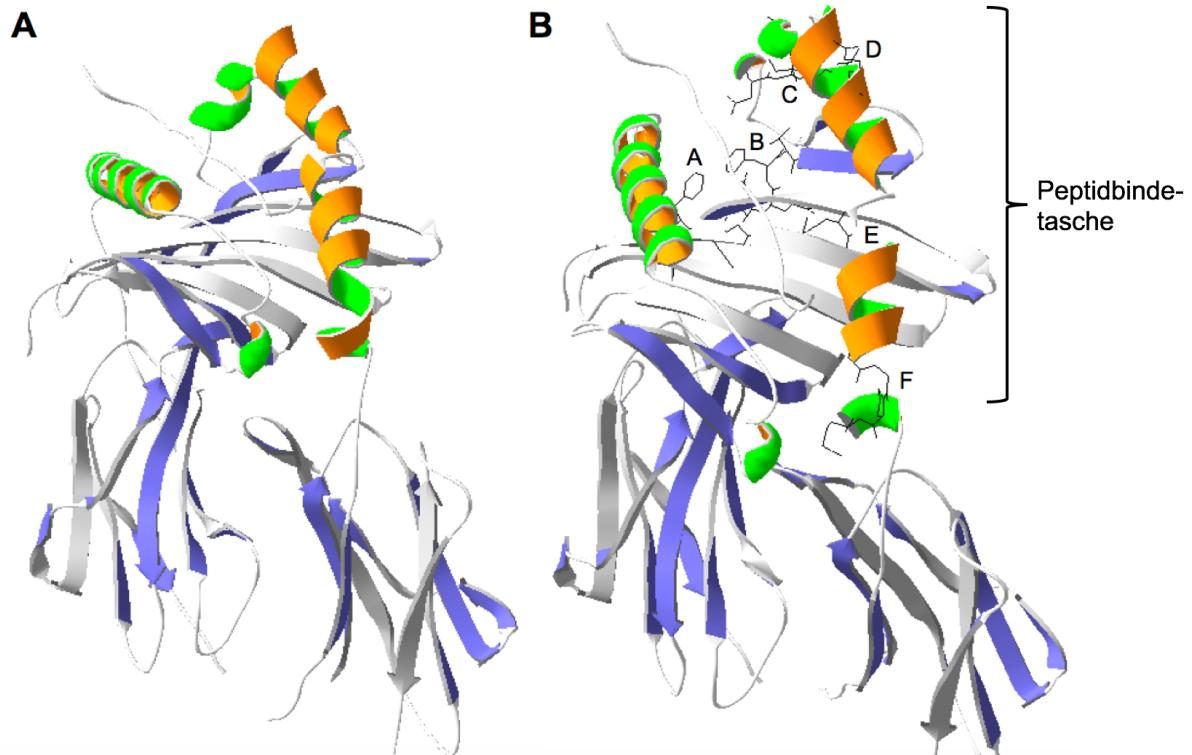


Abbildung 22: Tertiärstruktur von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*02:01

(A) Darstellung der Quartärstruktur basierend auf der Röntgenkristallographie von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*02:01; PDB-ID: 3LQZ (100). Der Blick geht dabei vom C-Terminus des Peptids in Richtung N-Terminus, wobei das Peptid als Linie in der Peptidbindetasche dargestellt ist. (B) Darstellung wie in A, lediglich die hypervariablen Domänen nach Cesbron et al. (194) sind als Aminosäurereste in schwarz markiert und mit A-F beschriftet. In der Umgebung dieser Domänen wurde die Darstellung der Sekundärstruktur deaktiviert.

## Diskussion

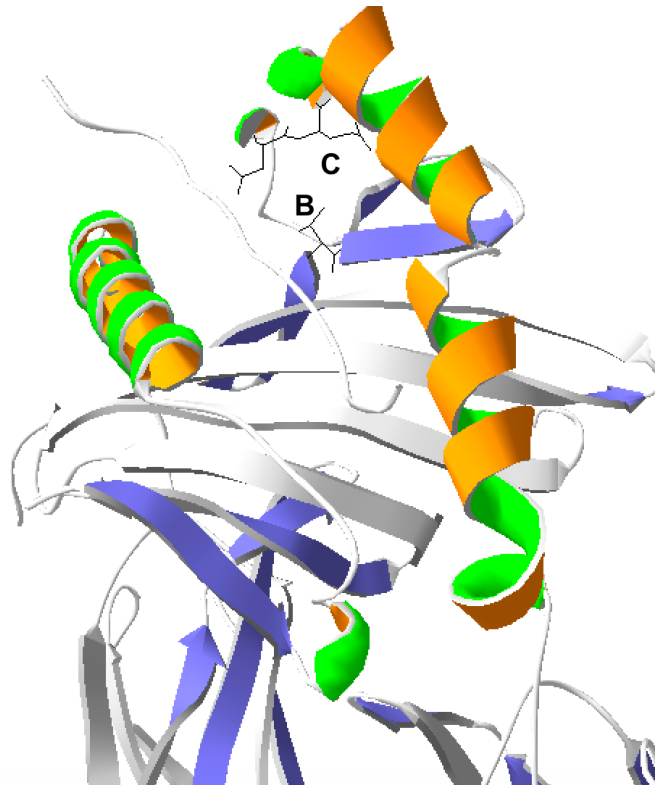


Abbildung 23: **Tolerierte hypervariable Domänen auf HLA-DPB1**

Darstellung der Quartärstruktur basierend auf der Röntgenkristallographie von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*02:01; PDB-ID: 3LQZ (100). Der Blick geht dabei vom C-Terminus des Peptids in Richtung N-Terminus, wobei das Peptid als Linie in der Peptidbindetasche dargestellt ist. In der Umgebung derjenigen hypervariablen Domänen (B, C) nach Cesbron et al. (194), in denen TZR<sub>11C12</sub> die Polymorphismen toleriert, wurde die Darstellung der Sekundärstruktur deaktiviert.

Die Analyse der Tertiärstruktur von HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*02:01, PDB-ID: 3LQZ (100) mit Hilfe von SWISS-MODEL und dessen Pdb-Viewer (78) bestätigt, dass die für die Alloreaktion relevanten hypervariablen Domänen so lokalisiert sind, dass sie Bestandteile der Peptidbindetasche (186,195) von HLA-DP bilden (Abb. 23). Die Domänen A<sub>8-11</sub> (LFQG) und B<sub>33-36</sub> (EEFV) bilden einen Teil der Faltblattstruktur am Boden der Peptidbindetasche. Die Domänen C<sub>55-57</sub> (DEE), D<sub>65-67</sub> (ILE), E<sub>76</sub> (M) und F<sub>84-87</sub> (GGPM) befinden sich auf der Helix der  $\beta$ -Kette, die die Peptidbindetasche begrenzt (Abb. 23). Der Polymorphismus E69K erzeugt eine  $-\text{COO}^-$  Gruppe, die von der Helix der  $\beta$ -Kette an der Peptidbindetasche ausgeht (100). Allein diese strukturelle Aberranz von HLA-DPB1\*02:01 lässt die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> völlig verschwinden. Nach der Mutation dieser AS in SWISS-MODEL zum Arginin, wie es auch in HLA-DPB1\*04:01, -DPB1\*04:02 und -DPB1\*105:01 vorkommt, ist die negativ geladene Carboxygruppe durch eine Aminogruppe ersetzt. Die tolerierten Polymorphismen der hypervariablen Regionen B (AS 35-37) und C (AS 55-57) (Tab. 11) liegen am Übergang des Bodens zur helikalen Begrenzung der Peptidbindetasche (Abb. 23).

## Diskussion

Auch wenn Studien zur Bindung von CD4 an das HLA-Klasse II gezeigt haben, dass die Bindung von CD4 durch Polymorphismen der  $\alpha$ -Kette des HLA-Klasse II verändert wird (186), ist dies für TZR<sub>11C12</sub> nicht sehr relevant. Die beiden hier getesteten HLA-DPA Allele weisen keinen Unterschied in der CD4-Bindungsstelle auf (88). Weil TZR<sub>11C12</sub> sein Epitop auch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennt (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe) und CD4 die Bindungseffizienz des TZR erhöht (88), muss von einem höher-affin bindenden Rezeptor ausgegangen werden. Das steht jedoch im Gegensatz zur fehlenden Tetramer-Bindung durch TZR<sub>11C12</sub>.

### 5.2 Peptidunabhängigkeit von TZR<sub>11C12</sub>

Das breite Spektrum an erkannten Zelllinien mit exprimiertem humanem HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 zeigt, dass TZR<sub>11C12</sub> für seine Bindung nicht auf ein spezifisches zellrestringiertes Peptid angewiesen ist oder aber ein konstitutiv exprimiertes Peptid erkennt. Diese konstitutiv exprimierten Peptide entstehen aus Strukturproteinen, die durch Autophagozytose und ähnliche Prozesse aufgenommen und prozessiert werden (197). Auch wurde eine spontane CLIP-Dissoziation von HLA-Klasse II diskutiert (106), die eine Beladung mit Peptiden aus dem ER ermöglicht. Da TZR<sub>11C12</sub> auch HLA-DPB1\*04:01 positive Tierzelllinien und die Zelllinie THP-1 erkannt hat, die das Platzhalterpeptid CLIP auf ihrer Oberfläche exprimiert, scheint die Erkennung eines konstitutiv exprimierten humanen Antigens unwahrscheinlich. Argumente, die für eine Peptidunabhängigkeit von TZR<sub>11C12</sub> sprechen, ergeben sich aus der näheren Betrachtung der Peptidbeladung des transfizierten HLA-DP.

In den Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs findet eine Peptidbeladung des HLA-Klasse II wie bereits beschrieben statt (Kapitel 2.6). In den Zelllinien nichthämatopoetischen Ursprungs, die nicht die intrazelluläre Ausstattung der professionell antigen-präsentierenden Zellen haben, wird das transfizierte HLA-DP anders prozessiert. Van Lith et al. haben gezeigt, dass HLA-DP weder die invariante Kette (Ii) noch HLA-DM für einen stabilen Aufbau seiner Proteinstruktur benötigt (182). Die strukturelle Integrität basiert auf einer oxidativen Assemblierung über Cysteinreste der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette im endoplasmatischen Retikulum (182). Durch das Fehlen der Beladungsproteine werden unspezifisch aus dem ER aufgenommene Peptide auf dem HLA-DP präsentiert (182). Jiang et al. konnten außerdem nachweisen, dass fehlgefaltete Proteine aus dem ER auf HLA Klasse II beladen werden (198). Diese präsentierten Epitope werden aufgrund

## Diskussion

der Abwesenheit von HLA-DM und –DO nicht mehr editiert. Unbeladene HLA-DP würden schnell degradieren und von der Zelloberfläche entfernt werden (106). Da durch spezifische, durch HLA-DM und –DO selektierte, und unspezifische Peptidbeladungsmechanismen potenziell eine Vielzahl an Peptiden auf das eingebrachte HLA-DP beladen werden konnte und TZR<sub>11C12</sub> dennoch eine große Zahl an Zellen erkannt hat, ist von einer funktionellen Peptidunabhängigkeit auszugehen.

Auch wenn in der Literatur bislang kein HLA-DP spezifischer peptidunabhängiger TZR beschrieben wurde, lässt sich das Verhalten von TZR<sub>11C12</sub> erklären. Peptidunabhängige TZR lassen sich meist nur mit Aufwand stimulieren und deren Frequenz ist sehr klein (199). Das von einem TZR erkannte Alloantigen kann als zusammengesetztes Strukturmotiv bestehend aus Peptid und HLA angesehen werden (80,200), sodass die Kreuzreaktivität gegenüber dem allogenen HLA auf einem Mimikry zur spezifisch erkannten Struktur beruht (200). Gestützt wird diese These von Arbeiten von Birnbaum et al.. Darin konnte gezeigt werden, dass TZR fast nie eine Spezifität gegenüber nur einem Peptid besitzen, sondern dass sie ein ganzes Spektrum an Peptiden, die auf HLA-Klasse II beladen sind und sich strukturell ähneln, erkennen (201). Die Interaktion von TZR zu allogenem HLA kann aber auch unabhängig von der Bindung des TZR zum Peptid gesehen werden (200). Das Peptid wird hierbei nicht als spezifisch erkanntes Element, sondern als unspezifische Struktur vom TZR gebunden, sodass eine „peptidunspezifische“ Reaktivität gegenüber allogenem HLA entsteht (200). Santori et al. haben in Untersuchungen eines HLA-Klasse I spezifischen, alloreaktiven und peptidunabhängigen TZR die These aufgestellt, dass bei peptidunabhängiger Bindung die Hauptbindungsenergie vom Kontakt des TZR zu den Helices des HLA ausgeht (202). Röntgenkristallographien von TZR gegen HLA Klasse II zeigten, dass die Kontaktfläche zwischen TZR und HLA 50% der Bindungsfläche ausmacht, wobei Substitutionen der Peptidstruktur an dieser Geometrie nur wenig änderten (201). Die CDR3-Domäne des TZR, die vornehmlich die Peptidbindung vornimmt (82), lässt bei alloreaktiven TZR durch seine Flexibilität eine Toleranz des auf dem HLA präsentierten Peptidspektrums zu (59).

### 5.3 Die Xenoreaktivität des TZR<sub>11C12</sub>

Im Rahmen dieses Projekts wurde eine Reihe von nicht humanen Zelllinien auf die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> getestet. Dabei ist aufgefallen, dass das HLA-DPB1\*04:01 nicht auf allen getesteten Zelllinien durch den TZR erkannt wurde. Auch wenn die Erkennung von Affenzellen über gesunde murine dendritische Zellen zu Schweinezellen abnimmt, wurden sie doch durch CD4<sup>+</sup> TZR<sub>11C12</sub><sup>+</sup> spezifisch erkannt.

Datenbankrecherchen zu Proteinstrukturen haben gezeigt, dass die Prozessierung des HLA-DP in xenogenen Zelllinien nicht grundsätzlich anders verläuft als in humanen Zellen. Die *invariant chain* (CD74) findet sich nach der Proteindatenbank des NCBI (203) in allen getesteten Zelllinien bis auf *Drosophila melanogaster*. Die Analyse der Primärstruktur zeigt eine recht konservierte HLA-Interaktionsdomäne, sodass eine Wechselwirkung wahrscheinlich scheint, auch wenn HLA-DP diese für die korrekte Assemblierung nicht benötigt (182). Für Mauszellen konnten in der Proteindatenbank des NCBI (203) Orthologe sowohl für HLA-DM als auch für HLA-DO gefunden werden. Der Vergleich beider Primär- und Tertiärstrukturen (PDB-ID: 2BC4 (HLA-DM) (204) und 1K8I (H2-DM) (205)) zeigt große Ähnlichkeiten, auch auf den mit HLA interagierenden Domänen, sodass von einer Interaktion der murinen Proteine mit dem transfizierten HLA-DP ausgegangen werden muss. In den murinen dendritischen Zellen und Mausmakrophagen RAW sollte die Peptidbeladung ähnlich den humanen professionell antigenpräsentierenden Zellen ablaufen. Da keine Orthologe von HLA-DM und – DO für die anderen xenogenen Zelllinien gefunden werden konnten (203), erfolgt die Assemblierung und Peptidbeladung des HLA-DP hier am ehesten über den bereits beschriebenen Weg nach einer oxidativen Assemblierung im endoplasmatischen Retikulum (106,111,182). Da die Bindung der spezifisch und unspezifisch beladenen Peptide von den Peptidbindetaschen auf HLA-DP und den Ankerdomänen der Peptide abhängt (201,206–208), sind die präsentierten Peptidmotive nicht grundsätzlich unterschiedlich zu humanen Peptiden. Da TZR<sub>11C12</sub> das HLA-DPB1\*04:01 auch auf Zellen xenogenen Ursprungs erkennt, wird die Hypothese der funktionellen Peptidunabhängigkeit gegenüber HLA-DPB1\*04:01 weiter unterstützt.

### 5.4 Peptidunabhängige Faktoren der Allo- und Xenoreaktion von TZR<sub>11C12</sub>

Trotz der funktionellen Peptidunabhängigkeit und der ähnlichen Peptidbeladung wurden nicht alle Tierzelllinien gleich gut erkannt. Weil der Verwandtschaftsgrad nicht die alleinige Erklärung für das Ausbleiben z.B. der Erkennung von murinen Tumorzelllinien liefert, müssen in diesem Fall weitere zellspezifische Faktoren vorliegen. Posttranslationale Veränderungen von HLA-Klasse II können die Immunantwort verändern und sind für Autoimmunreaktionen und Hypersensitivitätsreaktionen relevant (103,104). HLA-Klasse II tragen unter anderem Akzeptordomänen für N-Glykosylierungen an  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette (104). Lancaster et al. haben für Insektenzellen andere Muster der N-Glykosylierung von Proteinen nachgewiesen (209), was vermutlich die Erkennung von HLA-DPB1\*04:01 auf Schneider-Zellen beeinträchtigt. Je nach Expressionsvektor der Tetramere kann auch dadurch die Bindung von TZR<sub>11C12</sub> gestört werden.

Negative Immuncheckpoints, die die T-Zell Antwort gegen Tumoren herabregulieren können (210), zeigen ebenfalls eine Relevanz für die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub>. Der Rezeptor erkannte das humane HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 auf den murinen Melanomzellen B16 nicht. Weil TZR<sub>11C12</sub> gesunde murine dendritische Zellen erkannt hat, ist von einer Beeinflussung durch zellspezifische Faktoren auszugehen. Von B16-Zellen ist bekannt, dass sie eine starke Immunsuppression verursachen (211,212). Analysen zur Homologie mit Hilfe der Proteindatenbank des NCBI (203) zeigten, dass murine Zellen nicht nur wichtige immunsupprimierende Proteine wie PD-L1 und Galectin-9 (213) besitzen, sondern diese der humanen Form ähneln. Wie von Singer et al. beschrieben, könnte auch das Mikromilieu der Tumorzellen die T-Zell Antwort supprimieren (214). Zusätzlich könnten Proteine der immunologischen Synapse, die für die T-Zell Antwort benötigt werden (215), in den tierischen Zelllinien fehlen oder so modifiziert sein, dass die humanen T-Zellen nicht binden können.

### 5.5 Klinische Aspekte von TZR<sub>11C12</sub>

In diesem Projekt ist ein neuer TZR für die Reprogrammierung von T-Zellen charakterisiert worden, der einige für die adoptive T-Zell Therapie nützlichen Eigenschaften aufweist.

Das vom Rezeptor erkannte HLA-DP ist weniger polymorph als andere HLA (151), insbesondere HLA-Klasse I. HLA-Klasse II wird außerdem nur im inflammatorischen Milieu von nicht professionell antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (68), sodass

## Diskussion

ein selektiverer Effekt gegen Leukämieblasten als bei HLA-Klasse I restringierten Rezeptoren von TZR<sub>11C12</sub> ausgeht.

Ein wichtiger Aspekt bei der Suche einer optimalen Zielstruktur ist die Expressionshäufigkeit auf AML-Blasten. Da TZR<sub>11C12</sub> die beiden HLA-DPB1\*04:01 und –DPB1\*04:02 erkennt, können im Rahmen einer adoptiven T-Zell Therapie etwa 55% (151) der in der kaukasischen Bevölkerung vorkommenden Allele abgedeckt werden. Die Größe dieser potenziell erreichbaren Patientengruppe ist vergleichbar mit bereits klinisch erprobten leukämiespezifischen Zielstrukturen. WT1, die Zielstruktur eines HLA-A2 restringierten TZR wird in 70% der Fälle von den Leukämieblasten exprimiert (129). HLA-A2 wird dagegen nur von 50% der kaukasischen Bevölkerung getragen (216), sodass die Zielgruppe dieses TZR etwas eingeschränkt wird. Die CAR-Zielstruktur LeY wird in etwa 50% der Krankheitsfälle von den Leukämieblasten exprimiert (217). CD33, das eine Zielstruktur für CAR darstellt, wird in 90% der Fälle von den Leukämieblasten getragen. Allerdings ist die Expression nicht streng auf Blasten beschränkt, sodass schwerwiegende *on-target off-tumor* Nebenwirkungen beobachtet wurden (142).

Die funktionelle Peptidunabhängigkeit ist für die klinische Anwendung von besonderem Vorteil. Sie bietet eine höhere Flexibilität des Rezeptors im Vergleich zu den bereits bekannten TZR-basierten adoptiven T-Zell Therapien. Funktionell erkennt der TZR<sub>11C12</sub> das HLA-DPB1\*04:01/ -DPB1\*04:02, ähnlich wie die CAR ihre Zielstrukturen, als Oberflächenantigen. Die sonst für TZR-basierte adoptive T-Zell Therapien notwendige Kombination auf HLA und tumorspezifisches Antigen wird damit umgangen. Daher kann TZR<sub>11C12</sub> nicht nur Leukämieblasten erkennen, die ein bestimmtes, HLA-DP restringiertes Peptid exprimieren, sondern potenziell alle HLA-DPB1\*04:01/-DPB1\*04:02 tragenden Blasten. Darüber hinaus ist die Anwendung in der Therapie anderer maligner hämatologischer Erkrankungen möglich.

Fujiwara et al. haben den HLA-A2 abhängigen TZR gegen das WT1-Peptid auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich exprimiert. Damit ist nicht nur die Generation leukämiespezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen möglich, auch die Effektorfunktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen die Leukämieblasten kann genutzt werden (218). Gleiches gilt auch für TZR<sub>11C12</sub>. Da der TZR<sub>11C12</sub> auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich in HLA-DPB1\*04:01 spezifische Zellen umprogrammieren kann (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe), ist von einem Korezeptor-unabhängigen hochaffin bindenden TZR auszugehen (219). Das ermöglicht

## Diskussion

nicht nur den Transfer des Rezeptors in CD4<sup>+</sup> positive T-Zellen, die direkt Leukämieblasten zerstören, eine effektive Immunantwort durch ihre Helferfunktion aufrecht erhalten und einen antigenpräsentierenden Phänotyp der Blasten induzieren (150). Auch leukämiespezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können generiert werden.

Die in diesem Experiment gezeigte Beeinträchtigung der Erkennung durch zellabhängige Faktoren wie negative Immuncheckpoints und metabolische Faktoren muss in der Anwendung des Rezeptors bedacht werden. Distler et al. konnten zwar zeigen, dass AML-Blasten nicht zwingend große Mengen des inhibitorisch wirkenden Liganden PD-L1 exprimieren (131), dennoch sind negative Immuncheckpoints, regulatorische T-Zellen und die Herabregulation der Antigenpräsentation (132,210,220) bereits beschriebene Probleme adoptiver T-Zell Therapien. Lösungsversuche sind die Blockade der negativen Immuncheckpoints durch Antikörper (210) und die Suppression von T<sub>reg</sub>-Zellen (133,221). Die Effektivität der adoptiven T-Zell Therapie kann zusätzlich durch die Auswahl der richtigen T-Zell Subpopulation erhöht werden. Thomas et al. konnten zeigen, dass die Population der Gedächtnis T-Zellen nach TZR RNA Elektroporation eine längere Effektivität als die der naiven T-Zellen aufweist (52).

Da gerade in der akuten myeloischen Leukämie eine hohe Zellteilungsrate der malignen Zellen vorliegt und die Gefahr für das Tumorlysesyndrom sowie das Zytokin-Freisetzungssyndrom am ehesten mit der Tumorlast steigt (222,223), ist die Anwendung von TZR<sub>11C12</sub> vornehmlich in der Situation der minimal verbleibenden Restkrankheit (*minimal residual disease*) sinnvoll. In Beobachtungen von Chapuis et al. konnte in dieser Situation außerdem eine Verlängerung der Krankheitsremission beobachtet werden, während bei fortgeschrittener Erkrankung lediglich die Tumorzellzahl verringert werden konnte (134).

### 5.6 Sicherheitsaspekte von TZR<sub>11C12</sub>

Die Transfusion allogener T-Zellen trägt immer das Risiko einer GvHD (224). Das Sicherheitsprofil von TZR<sub>11C12</sub> wird außerdem von *on-target* und *off-target* Effekten bestimmt (136). Die Ergebnisse der Versuche mit verschiedensten Zelllinien zeigen zwar, dass der TZR *in vitro* keine spezifische Erkennung nicht HLA-DP exprimierender Zellen zeigt. Eine Aussage bezüglich anderer *off-target* Effekte kann jedoch erst nach weiterer *in vivo* Testung des Rezeptors getroffen werden.

## Diskussion

Die Selektivität gegenüber dem Antigen ist ein wesentlicher Faktor der Sicherheit des Rezeptors. Die Hochregulation von HLA-Klasse II findet nach allogener Stammzelltransplantation aufgrund der Proliferation der T-Zellen, der Gewebeschäden durch die Konditionierungstherapie und durch eine eventuelle Reaktivierung latenter Virusinfektionen statt (187). Unter inflammatorischen Bedingungen können auch Epithelien und Endothelien HLA-Klasse II exprimieren (68). Stevanovic et al. haben gezeigt, dass in diesem Fall auch nicht hämatopoetische Zellen Ziel von HLA-DP spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden können (187). Eine 24-stündige IFN- $\gamma$  Inkubation zur Herstellung eines lokalen inflammatorischen Milieu (225) konnte das HLA-DP auf der Keratinozytenzelllinie HaCat (HLA-DPB1\*04:01 positiv) heraufregulieren und die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> auslösen. Auf den ebenfalls herangezogenen Modellzelllinien für Leber und Darm (beide HLA-DPB1\*04:01 positiv) konnte HLA-DP im inflammatorischen Milieu zwar nicht heraufreguliert werden, nach der Expression von transfiziertem HLA-DPA1\*01:03/-DPB1\*04:01 erkannte TZR<sub>11C12</sub> die Zellen deutlich. Bereits *in vitro* ergeben sich somit Hinweise auf einen *on-target off-tumor* Effekt in inflammatorischer Situation, was einen wesentlichen Nachteil für die spätere klinische Anwendung darstellt. Durch die funktionelle Peptidunabhängigkeit von TZR<sub>11C12</sub> sind daher *on-target off-tumor* Effekte auf jeglichen HLA-DPB1\*04:01 exprimierenden Geweben denkbar.

Die Transduktion neuer TZR-Kettenpaare birgt das Risiko der Erzeugung von Fehlpaarungen, die im leichtesten Fall nur die Reaktivität des TZR beeinträchtigen. Im schlimmsten Fall entstehen TZR, die Neoepitope erkennen können (135). Modifikationen des TZR wie das Einfügen einer Disulfidbrücke, die Veränderung der konstanten Domänen oder die Verwendung von Leucin-Zippeln (66) können dieses Problem minimieren. Die Abschaltung endogener TZR-RNA mit Hilfe von siRNA stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar und wurde bereits *in vitro* erprobt (135). Der Transfer neuer TZR in virusspezifische T-Zellen bietet zusätzlich den Vorteil, dass die Anzahl der Fehlpaarungen aufgrund des kleineren endogenen TZR-Ketten Repertoires begrenzt ist (226). Weitere Nebenwirkungen adoptiver T-Zell Therapien sind in klinischen Studien bereits erkannt worden. Bei großen Mengen maligner Zellen sind Tumorlysesyndrome beschrieben (136). Die Beschränkung der Anwendung auf Fälle mit *minimal residual disease* sollten diese in der Anwendung von TZR<sub>11C12</sub> lösen. Die massenhafte Freisetzung inflammatorischer Zytokine erzeugt überdies noch das *cytokine release syndrome* (CRS), das vor allem Patienten mit noch vorhandenen Tumorresten betrifft

## Diskussion

(145). Durch die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen kann es zu einer Aktivierung von Makrophagen kommen, die Hämophagozytose, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie auslösen (145). Potenziell lebensgefährlich sind die disseminiert intravasale Gerinnung, Nieren- und Leberversagen, das akute progressive Lungenversagen und neurotoxische Wirkungen der Zytokine (222). Als Hauptmediator des CRS wird derzeit IL-6 diskutiert. In einer Fallanalyse von Lee et al. mussten alle beobachteten Patienten intensivmedizinisch aufgrund von Ateminsuffizienzen und Organversagen betreut werden. Durch die frühzeitige Anwendung von Steroiden konnten die Zytokinlevels normalisiert werden, auch wenn bei wenigen Patienten Organdysfunktionen nach Normalisierung der Zytokine auftraten (222). Eingebrachte Modifikationen in die TZR, die nicht humanen Rezeptoren entsprechen, können allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen (136).

Aufgrund der Nebenwirkungen von adoptiven T-Zellen, die sowohl *on-target* als auch *off-target* Effekte ausüben, müssen Sicherheitsmechanismen zur Inaktivierung der Zellen überlegt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Veränderung der Zellen durch RNA-Elektroporation, bei der der Effekt der eingebrachten mRNA wegen der Endozytose der TZR nur wenige Tage anhält (227). Die Inaktivierung transfundierter T-Zellen mittels einer Apoptoseinduktion durch das von Di Stasi et al. beschriebene Caspase-9 System ist ebenfalls denkbar (228). Das von Greco et al. vorgeschlagene Konzept zur Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels der HSV-Thymidinkinase könnte ebenfalls für die TZR<sub>11C12</sub>-Therapie angewandt werden. Hierbei entstehen nach Verabreichung von Ganciclovir toxische Metabolite in Zellen, die das eingebrachte Enzym exprimieren (224). Nach der Expression von zusätzlichen Oberflächenmarkern wie CD20 oder Peptidmotiven von humanem EGF-R-Peptid können Antikörper zur Depletion eingesetzt werden (224,229). Molekulare Schalter, wie sie von Wu et al. für CAR gezeigt wurden, lassen durch ein gezieltes Einschalten des Rezeptors eine kontrollierte Therapie zu (230). Dafür muss zunächst ein single-chain Rezeptor aus TZR<sub>11C12</sub> hergestellt werden, an dessen Signaldomänen sich eine Zielstruktur für den molekularen Schalter befindet.

### 5.7 Zusammenfassung und Ausblick

Nach allogener hämatopoetische Stammzelltransplantation sind T-Zell basierte Therapien eine der wesentlichen Optionen, um den Krankheitsrückfall der Leukämie zu verhindern (122). Werden im Rahmen einer *donor lymphocyte infusion* unselektierte T-Zellen des Spenders im Verlauf nach der Transplantation transfundiert, so ist dies bei der AML nicht nur ineffektiv, sondern auch mit dem Risiko der Induktion einer GvHD assoziiert (126). Um den GvL-Effekt zu fördern und das Risiko für die GvHD zu senken, werden weitere Verfahren entwickelt. Eine Möglichkeit besteht darin, gentechnisch modifizierte, tumorspezifische T-Zellen zu transfundieren. Obwohl Leukämieblasten viele Antigene exprimieren (129), bleibt die Suche nach geeigneten und sicheren Zielstrukturen schwierig (132). Der in dieser Arbeit charakterisierte TZR<sub>11C12</sub> stellt einen neuen Ansatz zur TZR-basierten adoptiven T-Zell Therapie dar.

Im vorliegenden Projekt konnte gezeigt werden, dass der TZR eine spezifische Reaktivität gegenüber den zwei am häufigsten vorkommenden Allelen HLA-DPB1\*04:01 und -DPB1\*04:02 aufweist. Die adoptive T-Zell Therapie mit diesem Rezeptor kann daher bei mehr als 50% der Patienten angewandt werden (151). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Kette des HLA-DP keinen Einfluss auf die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> hat. In Experimenten mit unterschiedlichen humanen und xenogenen Zelllinien konnte eine funktionelle Peptidunabhängigkeit des TZR nachgewiesen werden. Diese bietet die Chance, unabhängig von HLA-DP restringierten Peptiden ein breites Spektrum an HLA-DPB1\*04:01 oder -DPB1\*04:02 tragenden malignen Erkrankungen zu therapieren. Versuche mit Insektenzellen zeigten eine Beeinflussung der Erkennung durch posttranslationale Modifikationen des HLA-DP. Weitere Faktoren, die die Erkennung durch TZR<sub>11C12</sub> herabregulieren können, waren immunsupprimierende Liganden oder das metabolische Milieu der Tumorzellen. In Experimenten mit artifiziell hergestellten HLA-DP Tetrameren konnte keine Bindung an den TZR nachgewiesen werden, sodass von einem dafür zu niedrig affinen Rezeptor ausgegangen werden muss oder die Tetramere aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen nicht gebunden werden.

Das Ergebnis der Charakterisierung zeigt außerdem, dass der TZR aufgrund der funktionellen Peptidunabhängigkeit ein Potenzial für *on-target off-tumor* Reaktivität besitzt. GvHD-Modellzelllinien aus Haut, Darm und Leber wurden, wenn sie HLA-DP exprimierten, deutlich erkannt. Daher müssen Strategien überlegt werden, um die Sicher-

## Diskussion

heit der Therapie zu gewährleisten. Geeignet erscheinen die RNA-Elektroporation aufgrund ihrer transienten Expression, die Verwendung von sogenannten on-switch Domänen oder die Ausschaltung der veränderten T-Zellen mittels verschiedener Mechanismen.

Zusammenfassend ist damit festzustellen, dass der funktionell peptidunabhängige TZR<sub>11C12</sub> spezifisch HLA-DPB1\*04:01 und –DPB1\*04:02 erkennt. Das ermöglicht nicht nur die Therapie einer großen Patientengruppe, sondern auch anderer maligner hämatologischer Erkrankungen neben der AML. Neben der Beeinflussung der Erkennung durch immunsupprimierende Liganden, ist die Möglichkeit der Induktion einer GvHD-ähnlichen *on-target off-tumor* Reaktivität im Rahmen einer möglichen Therapie zu beachten.

Zur weiteren Charakterisierung der Zielstruktur und zur endgültigen Identifikation des gebundenen Antigens sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Analyse einer Peptidelution der erkannten HLA-DPB1\*04:01 und –DPB1\*04:02 durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) (231) könnte die Frage beantworten, welche Peptide auf die eingebrachten HLA-DP beladen wurden. Um die Bindungsgeometrie des TZR und die Beteiligung der CDR-Domänen an der Bindung festzustellen, wäre die Anfertigung einer Röntgenkristallographie nötig.

Die Effektivität des Rezeptors kann durch weitere Modifikationen des TZR verbessert werden. Darunter fallen Minimalmurinisierung konstanter Ketten zur Verhinderung von Fehlpaarungen, aber auch das Einbringen gezielter Veränderungen zur Affinitätserhöhung (66). Da sich das Potenzial für eine *on-target off-tumor*-Reaktivität gezeigt hat, muss das Sicherheitsprofil des Rezeptors vor der klinischen Anwendung noch verbessert werden. Dazu ist die Klonierung der beiden variablen Ketten des Rezeptors an eine einzelne konstante Kette (*single chain TCR*) notwendig (66), um danach *on-switch* Domänen implementieren zu können (230). Alternativ sind auch Strategien zum Ausschalten der T-Zellen denkbar (Kapitel 5.6). Außerdem ist eine klinische Studie zur Anwendung des TZR erst möglich, wenn die Effektivität der TZR<sub>11C12</sub> basierten adoptiven T-Zell Therapie *in vivo* nachgewiesen werden konnte.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ARCA	Anti reverse Cap Analogon
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CDR	Codon Determining Region
CLIP	Invariant Chain Peptide
CRS	Cytokine Release Syndrome
DC	Dendritische Zelle
DLI	Donor lymphocyte infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Do	Donor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-PAP	E.coli Poly (A) Polymerase I
E.coli	Escherichia coli
EBV	Eppstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF-R	Epithelial Growth Factor - Receptor
ELN	EuropeanLeukemiaNet
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAB	French-American-British Einteilung der AML
FACS	Durchflusszytometrie
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein
FLT3	Fms-like Tyrosinkinase 3 (CD135)
gam	Gout anti mouse
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten koloniestimulierender Faktor
GvH	Graft versus Host
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
HLA	Human Leukocyte Antigen
HS	Humanserum

## Verzeichnisse

HSV	Herpes-Simplex Virus
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor-tyrosine based activation motif
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LDH	Lactatdehydrogenase
li	Invariante Kette (CD74)
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MIIC	MHC-class II Compartment
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NTP	Nukleotidtriphosphate
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand
PE	Phytoerythrocin
rH	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
siRNA	short interfering RNA
TAP	Transporter associated with Antigen processing
TCE	T-Zell Epitop
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TZR	T-Zell Rezeptor
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms Tumor Protein

## 7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: EFFEKTE DER TRANSFUNDIERTEN SPENDER T-LYMPHOZYTEN .....	12
ABBILDUNG 2: ÜBERBLICK ÜBER DIE BEIDEN T-ZELL GRUPPEN .....	14
ABBILDUNG 3: STRUKTUR DES TZR .....	15
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SELEKTION VON T-LYMPHOZYTEN IM THYMUS .....	16
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PEPTIDBELADUNG VON HLA-KLASSE I UND KLASSE II .....	19
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IM LYMPHKNOTEN STATTFINDENDEN T-ZELL REIFUNG .....	20
ABBILDUNG 7: ALLELFREQUENZ DER HLA-DP IN DER KAUKASISCHEN BEVÖLKERUNG .....	25
ABBILDUNG 8: EXPRESSION VON TZR <sub>11C12</sub> IN DEN FÜNF VERWENDETEN CD4 <sup>+</sup> -T-ZELL-DONOREN .....	46

## Verzeichnisse

ABBILDUNG 9: TEST DER AML-ZELLINIEN HL-60, THP-1 UND KG-1 .....	48
ABBILDUNG 10: EXPRESSION VON HLA-DP AUF VERSCHIEDENEN HUMANEN ZELLINIEN NACH DER ELEKTROPORATION .....	50
ABBILDUNG 11: ERKENNUNG HUMANER HÄMATOPOETISCHER UND NICHT-HÄMATOPOETISCHER ZELLINIEN DURCH TZR <sub>11C12</sub> <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN VOR UND NACH ELEKTROPORATION MIT DEM HLA-DPA1*01:03/-DPB1*04:01-ALLEL .....	51
ABBILDUNG 12: NACHWEIS DES CLIP MITTELS ANTI-CLIP PE AUF THP-1 ZELLEN NACH ELEKTROPORATION MIT HLA-DPA1*01:03/-DPB1*04:01 AUF DEN HLA-KLASSE II HLA-DR, -DQ UND -DP .....	52
ABBILDUNG 13: EXPRESSION VON HLA-DP AUF DEN GETESTETEN TIERZELLINIEN .....	54
ABBILDUNG 14: ERKENNUNG DER MIT UND OHNE RNA ELEKTROPORIERTEN TIERZELLINIEN GEGEN TZR <sub>11C12</sub> IM ELISPOT .....	55
ABBILDUNG 15: TEST MURINER DENDRITISCHER ZELLEN ALS TRÄGER DES HLA-DP .....	57
ABBILDUNG 16: TEST DER IN DER KAUKASISCHEN BEVÖLKERUNG HÄUFIG VORKOMMENDEN HLA-DP .....	60
ABBILDUNG 17: TEST UNTERSCHIEDLICHER HLA-DPA/-DPB KETTENPAARUNGEN .....	62
ABBILDUNG 18: TEST UNTERSCHIEDLICHER TZR-KETTENPAARUNGEN IN CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN .....	64
ABBILDUNG 19: TESTUNG DER GVHD-MODELLZELLINIEN OHNE RNA, MIT RNA ELEKTROPORIERT UND NACH IFN- $\gamma$ INKUBATION .....	67
ABBILDUNG 20: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER TETRAMERBINDUNG AN CD4 <sup>+</sup> TZR <sub>11C12</sub> .....	68
ABBILDUNG 21: TEST DER PEPTIDBELADENEN THP-1 UND EL-4 .....	70
ABBILDUNG 22: TERTIÄRSTRUKTUR VON HLA-DPA1*01:03/-DPB1*02:01 .....	73
ABBILDUNG 23: TOLERIERTE HYPERVARIABLE DOMÄNEN AUF HLA-DPB1 .....	74

## 8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: FAB-KLASSIFIKATION DER AML .....	6
TABELLE 2: WHO-KLASSIFIKATION DER AML VON 2008 MIT DER REVISION VON 2016 .....	6
TABELLE 3: ÜBERSICHT VON ZYTOGENETISCHEN ABERRATIONEN DER AML MIT RISIKOPROFIL NACH EUROPEANLEUKEMIANET (DÖHNER ET AL. 2017 (25)) .....	8
TABELLE 4: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ADHÄRENTEN HUMANEN ZELLINIEN .....	40
TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN HUMANEN SUSPENSIONSZELLINIEN .....	41
TABELLE 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN TIERZELLINIEN .....	42
TABELLE 7: EXPRESSION VERSCHIEDENER HLA-DP AUF K562, HELA UND JURKAT .....	58
TABELLE 8: EXPRESSIONSANALYSE DER UNTERSCHIEDLICHEN HLA-DP KETTENPAARUNGEN IN K562, HELA UND JURKAT .....	63
TABELLE 9: ÜBERSICHT DER ERKENNUNG DER HLA-DP KETTENPAARUNGEN DURCH CD4 <sup>+</sup> TZR <sub>11C12</sub> IM ELISPOT .....	63
TABELLE 10: ERGEBNISSE DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN MESSUNGEN DER CLIP-EXPRESSION AUF THP-1 .....	70
TABELLE 11: SEQUENZUNTERSCHIEDE DER RELEVANTEN HYPERVARIABLEN DOMÄNEN DES HLA-DP .....	72

## 9 Literaturverzeichnis

1. Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, u. a. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(7):599–609.
2. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, u. a. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001;112(4):988–94.
3. Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, u. a. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood. American Society of Hematology;* 2009;113(12):2851–8.
4. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, Madrigal JA, Begovich AB, Horowitz MM, u. a.

- The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood*. American Society of Hematology; 2007;110(13):4560–6.
5. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang H, Aljurf M, u. a. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014;124(16):2596–607.
  6. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SAP, van der Meijden ED, Griffioen M, Oudshoorn M, Willemze R, u. a. HLA-DPB1 mismatching results in the generation of a full repertoire of HLA-DPB1-specific CD4+ T cell responses showing immunogenicity of all HLA-DPB1 alleles. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2010;16(9):1282–92.
  7. Herr W, Eichinger Y, Beshay J, Bloetz A, Vatter S, Mirbeth C, u. a. HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31:434–55.
  8. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2011/2012. 2015.
  9. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099–107.
  10. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD, Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136–52.
  11. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894–907.
  12. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *Med Prog*. 2006;341(14):1051–62.
  13. Döhner H, Estey E, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, u. a. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74.
  14. Heilmeier B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, u. a. Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klin*. 2007;102(4):296–308.
  15. Neame P, Soamboonsrup P, Browman G, Meyer R, Bengner A, Wilson W, u. a. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*. 1986;68(6):1355–62.
  16. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, u. a. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17(12):3835–49.
  17. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, u. a. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451–8.
  18. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick HR, u. a. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. Blackwell Publishing Ltd; Juli 1991;78(3):325–9.
  19. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. October. 2002;100(7):2292–302.
  20. Buske C, Spiekermann K, Braess J, Hiddemann W. Akute myeloische Leukämie. In: *Die Onkologie Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*.

2. Aufl. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. S. 1637–71.
21. Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A, u. a. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–52.
  22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, u. a. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
  23. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik V, Paschka P, Roberts N, u. a. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–21.
  24. Stoelzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlaegel U, Bochtler T, Berdel W, u. a. Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2016;6(1):e386.
  25. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Ebert BL, u. a. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–48.
  26. Ley TJ, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia The Cancer Genome Atlas Research Network. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059–74.
  27. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, u. a. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3 -ITD – positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2015;124(23):3441–50.
  28. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
  29. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, u. a. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3360–8.
  30. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 2013;381(9865):484–95.
  31. Koreth J, Schlenk R, Kopecky K, Honda S, Sierra J, Djulbegovich B, u. a. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a systematic review and meta- analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009;301(22):2349–61.
  32. Schlenk RF. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(11):1663–70.
  33. Kadia TM, Ravandi F, Cortes J, Kantarjian H. New drugs in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*. 2016;27(5):770–8.
  34. Thol F, Schlenk RF, Heuser M, Ganser A. How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(3):319–28.
  35. Tsai C-H, Hou H-A, Tang J-L, Liu C-Y, Lin C-C, Chou W-C, u. a. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(7):1485–92.
  36. Stein EM, Tallman MS, Consortium HP-LGP, Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B, u. a. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood*. American Society of Hematology; 2016;127(1):71–8.
  37. Kanate AS, Pasquini MC, Hari PN, Hamadani M. Allogeneic hematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions. *World J Stem Cells*. 2014;6(2):69–81.
  38. Cornelissen JJ, Van Putten WLJ, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SMG, u. a. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of

- myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: Benefits for whom? *Blood*. 2007;109(9):3658–66.
39. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, u. a. Marrow Transplantation in the Management of Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *N Engl J Med*. 1998;339(23):1649–56.
  40. Vellenga E, Putten W Van, Ossenkuppele GJ, Verdonck LF, Theobald M, Jan J, u. a. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(23):6037–42.
  41. Wang J, Ouyang J, Zhou R, Chen B, Yang Y. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: A meta-analysis of randomized trials. *Acta Haematol*. 2010;124(2):61–71.
  42. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, Milligan D, Prentice A, Yin J, u. a. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J Clin Oncol*. 2013;31(10):1293–301.
  43. Aoudjhane M, Labopin M, Gorin N, Shimoni A, Ruutu T, Kolb H-J, u. a. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey. *Leukemia*. 2005;19(12):2304–12.
  44. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550–61.
  45. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354:1813–26.
  46. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother*. 2016;22(8):505–14.
  47. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first CR. *Blood*. 2016;127(1):62–71.
  48. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, u. a. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110(13):4576–83.
  49. Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(5):588–93.
  50. Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, u. a. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*. American Society of Hematology; 2013;122(18):3220–9.
  51. Ciáurriz M, Zabalza A, Beloki L, Mansilla C, Pérez-Valderrama E, Lachén M, u. a. The immune response to cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(21):4049–62.
  52. Thomas S, Klobuch S, Besold K, Plachter B, Dörrie J, Schaft N, u. a. Strong and sustained effector function of memory- versus naïve-derived T cells upon T-cell receptor RNA transfer: Implications for cellular therapy. *Eur J Immunol*. 2012;42(12):3442–53.
  53. Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol*. 2015;101(5):452–66.
  54. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001;166(2):973–81.
  55. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson I a. How TCRs bind MHCs, peptides, and

- coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:419–66.
56. Whitelegg AME, Oosten LEM, Jordan S, Kester M, van Halteren AGS, Madrigal JA, u. a. Investigation of Peptide Involvement in T Cell Allorecognition Using Recombinant HLA Class I Multimers. *J Immunol.* 2005;175(3):1706–14.
  57. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):371–80.
  58. Battaglia M, Gorski J. Overlap of direct and indirect alloreactive T-cell repertoires when MHC polymorphism is limited to the peptide binding groove. *Hum Immunol.* 2002;63(2):91–100.
  59. Whitelegg A, Barber LD. The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens.* 2004;63(2):101–8.
  60. Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med.* 2011;89(9):833–45.
  61. Zeiser R. Activation of Innate Immunity in Graft-versus-Host Disease : Implications for Novel Targets. *Oncol Res Treat.* 2015;38(5):239–43.
  62. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ. Biologic markers of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(3):324–31.
  63. Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens.* 2013;81(4):183–93.
  64. Weisdorf D, Zhang MJ, Arora M, Horowitz MM, Rizzo JD, Eapen M. Graft-versus-Host Disease Induced Graft-versus-Leukemia Effect: Greater Impact on Relapse and Disease-Free Survival after Reduced Intensity Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(11):1727–33.
  65. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, u. a. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(3):555–62.
  66. Spear TT, Nagato K, Nishimura MI. Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(6):631–49.
  67. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777–89.
  68. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2):S3–23.
  69. Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, u. a. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin Immunol.* 2013;25(4):252–62.
  70. Edinger M. Driving allotolerance: CAR-expressing Tregs for tolerance induction in organ and stem cell transplantation. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1248–50.
  71. Yasukawa M, Ohminami H, Yakushijin Y, Arai J, Hasegawa A, Ishida Y, u. a. Fas-independent cytotoxicity mediated by human CD4+ CTL directed against herpes simplex virus-infected cells. *J Immunol.* 1999;162(10):6100–6.
  72. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):88–100.
  73. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2):33–40.
  74. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 2002;111(7):967–79.
  75. Xu C, Call ME, Wucherpfennig KW. A membrane-proximal tetracysteine motif contributes to assembly of CD3deltaepsilon and CD3gammaepsilon dimers with the T cell receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(48):36977–84.
  76. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591–619.

## Verzeichnisse

77. Deng, L., Langley, R.J., Brown, P.H., Xu, G., Teng, L., Wang, Q., Gonzales, M.I., Callender, G.G., Nishimura, M.I., Topalian, S.L., Mariuzza RA. Structural basis for the recognition of mutant self by a tumor-specific, MHC class II-restricted T cell receptor. *Nat Immunol.* 2007;8(4):398–408.
78. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18(15):2714–23.
79. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology.* 9th ed. New York; London: Garland Science; 2017.
80. Garcia KC, Adams JJ, Feng D, Ely LK. The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat Immunol.* 2009;10(2):143–7.
81. Freeman JD, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Res.* 2009;19(10):1817–24.
82. Davis-Harrison RL, Insaïdoo FK, Baker BM. T cell receptor binding transition states and recognition of peptide/MHC. *Biochemistry.* 2007;46(7):1840–50.
83. Schatz DG, Swanson PC. V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annu Rev Genet.* 2011;45(1):167–202.
84. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377–91.
85. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):309–22.
86. Wu LC, Tuot DS, Lyons DS, Garcia KC, Davis MM. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature.* 2002;418:552–6.
87. Smith SN, Wang Y, Baylon JL, Singh NK, Baker BM, Tajkhorshid E, u. a. Changing the peptide specificity of a human T-cell receptor by directed evolution. *Nat Commun.* 2014;5(5223):1–13.
88. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Frontiers in Immunology.* 2013. S. 1–11.
89. Tikhonova AN, Van Laethem F, Hanada K, Lu J, Pobezinsky LA, Hong C, u. a.  $\alpha\beta$  T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities. *Immunity.* 2012;36(1):79–91.
90. Martín-Cófreces NB, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Immune synapse: Conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol.* 2014;24(1):61–72.
91. Dustin ML. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(11):1023–33.
92. Little A-M, Marsh SG, Madrigal JA. Histocompatibility. In: *Postgraduate Haematology.* 2011. S. 710–20.
93. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood.* 2013;122(11):1863–72.
94. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 1987;329(6139):506–12.
95. Williams A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens.* 2002;59(1):3–17.
96. Groothuis TAM, Neefjes J. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med.* 2005;202(10):1313–8.

## Verzeichnisse

97. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-directing CD4<sup>n+</sup> T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: The core is not enough. *Front Immunol.* 2013;4(172):1–9.
98. Bryant P, Ploegh H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(1):96–102.
99. Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(4):271–82.
100. Dai S, Murphy AG, Crawford F, Mack DG, Falta MT, Marrack P, u. a. Crystal structure of HLA-DP2 and implications for chronic beryllium disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(16):7425–30.
101. van Luijn MM, Chamuleau MED, Thompson JA, Ostrand-Rosenberg S, Westers TM, Souwer Y, u. a. Class II-associated invariant chain peptide down-modulation enhances the immunogenicity of myeloid leukemic blasts resulting in increased CD4<sup>+</sup> T-cell responses. *Haematologica.* 2010;95(3):485–93.
102. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature.* 1991;349(6311):669–76.
103. Unanue ER, Turk V, Neefjes J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2016;34(1):annurev-immunol-041015-055420.
104. Ryan SO, Cobb BA. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Semin Immunopathol.* 2012;34(3):425–41.
105. Rudd PM. Glycosylation and the Immune System. *Science (80- ). American Association for the Advancement of Science;* 2001;291(5512):2370–6.
106. Busch R, Rinderknecht CH, Roh S, Lee AW, Harding JJ, Burster T, u. a. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev.* 2005;207:242–60.
107. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell.* 1995;82(1):155–65.
108. Mellins ED, Stern LJ. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Curr Opin Immunol.* 2014;26:115–22.
109. Pos W, Sethi DK, Wucherpfennig KW. Mechanisms of peptide repertoire selection by HLA-DM. *Trends Immunol.* 2013;34(10):495–591.
110. Brocke P, Garbi N, Momburg F, Hämmerling GJ. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: Functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(1):22–9.
111. van Lith M, Benham AM. The DMalpha and DMbeta chain cooperate in the oxidation and folding of HLA-DM. *J Immunol.* 2006;177(8):5430–9.
112. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.* 2006;27(5):235–43.
113. Henson SM, Riddell NE, Akbar AN. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(4):476–81.
114. Ivetic A, Ridley AJ. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(6):1118–21.
115. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, Bouteiller O de, Dieu-Nosjean MC, Homey B, u. a. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin.* 2000;22(4):345–69.
116. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563–604.
117. Linsley PS, Ledbetter J a. The Role of the CD28 Receptor during T Cell

- Responses to Antigen. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:191–212.
118. Polonsky M, Chain B, Friedman N. Clonal expansion under the microscope: studying lymphocyte activation and differentiation using live-cell imaging. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(3):242–9.
  119. Dong C, Martinez GJ. T cells : the usual subsets. *Nat Rev I.* 2010;10(9).
  120. Madri J, Graesser D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol.* 2000;7(2–4):103–16.
  121. Ringdén O, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Uhlin M. The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br J Haematol.* 2009;147(5):614–33.
  122. Dotti G. Control of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2015;22(6):489–96.
  123. Slavin S, Morecki S, Weiss L, Or R. Donor lymphocyte infusion: the use of alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):265–76.
  124. Scarisbrick JJ, Dignan FL, Tulpule S, Gupta ED, Kolade S, Shaw B, u. a. A multicentre UK study of GVHD following DLI: rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(1):62–7.
  125. Bachireddy P, Wu CJ. Understanding anti-leukemia responses to donor lymphocyte infusion. *Oncoimmunology.* Landes Bioscience; 2014;3:e28187.
  126. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(7):528–38.
  127. Kolb H-J. ASH 50th anniversary review Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Hematology.* 2011;112(12):4371–83.
  128. Eefting M, de Wreede LC, Halkes CJM, von dem Borne PA, Kersting S, Marijt EWA, u. a. Multi-state analysis illustrates treatment success after stem cell transplantation for acute myeloid leukemia followed by donor lymphocyte infusion. *Haematologica.* 2016;101(4):506–14.
  129. Garber HR, Mirza A, Mittendorf EA, Alatrash G. Adoptive T-cell therapy for Leukemia. *Mol Cell Ther.* 2014;2(25):1–22.
  130. Rosenblatt J, Stone RM, Uhl L, Neuberg D, Joyce R, Levine JD, u. a. Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci Transl Med.* 2016;8(368ra171):1–7.
  131. Distler E, Albrecht J, Brunk A, Khan S, Schnürer E, Frey M, u. a. Patient-individualized CD8 + cytolytic T-cell therapy effectively combats minimal residual leukemia in immunodeficient mice. *Int J Cancer.* 2016;138(5):1256–68.
  132. McLaughlin L, Cruz CR, Bollard CM. Adoptive T-cell therapies for refractory/relapsed leukemia and lymphoma: current strategies and recent advances. *Ther Adv Hematol.* 2015;6(6):295–307.
  133. Rezvani K, Barrett AJ. Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(3):437–53.
  134. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, u. a. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med.* 2013;5(174):174ra27.
  135. Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S, An J, Nagai K, Shirakata T, u. a. Novel

- adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood*. 2011;118(6):1495–503.
136. Fujiwara H. Adoptive immunotherapy for hematological malignancies using T cells gene-modified to express tumor antigen-specific receptors. *Pharmaceuticals*. 2014;7(12):1049–68.
  137. Arber C, Feng X, Abhyankar H, Romero E, Wu M-F, Heslop HE, u. a. Survivin-specific T cell receptor targets tumor but not T cells. *J Clin Invest*. 2015;125(1):157–68.
  138. Heiblig M, Elhamri M, Michallet M, Thomas X. Adoptive immunotherapy for acute leukemia: New insights in chimeric antigen receptors. *World J Stem Cells*. 2015;7(7):1022–38.
  139. Tettamanti S, Biondi A, Biagi E, Bonnet D. CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? *Oncoimmunology*. 2014;3:e28835.
  140. Maude S, Barrett DM. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2015;172(1):11–22.
  141. Maus M V, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014;123(17):2625–35.
  142. Wang Q, Wang Y, Lv H, Han Q, Fan H, Guo B, u. a. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther*. 2015;23(1):184–91.
  143. Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, Camisa B, Norelli M, Genovese P, u. a. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood*. 2013;122(20):3461–72.
  144. Fujiwara H. Adoptive T-cell therapy for hematological malignancies using T cells gene-modified to express tumor antigen-specific receptors. *Int J Hematol*. 2014;99(2):123–31.
  145. Tey S-K. Adoptive T-cell therapy: adverse events and safety switches. *Clin Transl Immunol*. 2014;3(6):e17.
  146. Raman MCC, Rizkallah PJ, Simmons R, Donnellan Z, Dukes J, Bossi G, u. a. Direct molecular mimicry enables off-target cardiovascular toxicity by an enhanced affinity TCR designed for cancer immunotherapy. *Sci Rep*. 2016;6(18851):1–10.
  147. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, u. a. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(7):1437–44.
  148. Zino E, Frumento G, Markt S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S, u. a. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103(4):1417–24.
  149. Rutten C, van Luxemburg-Heijs SAP, Griffioen M, Marijt EWA, Jedema I, Heemskerk MHM, u. a. HLA-DP as specific target for cellular immunotherapy in HLA class II-expressing B-cell leukemia. *Leukemia*. 2008;22(7):1387–94.
  150. Stevanović S, Griffioen M, Nijmeijer BA, van Schie MLJ, Stumpf AN, Rutten CE, u. a. Human allo-reactive CD4+ T cells as strong mediators of anti-tumor immunity in NOD/scid mice engrafted with human acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(2):312–22.
  151. Hollenbach JA, Madbouly A, Gragert L, Vierra-Green C, Flesch S, Spellman S,

- u. a. A combined DPA1~DPB1 amino acid epitope is the primary unit of selection on the HLA-DP heterodimer. *Immunogenetics*. 2012;64(8):559–69.
152. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SAP, van der Meijden ED, Griffioen M, Oudshoorn M, Willemze R, u. a. Both permissive and nonpermissive HLA-DPB1 mismatches can induce polyclonal HLA-DPB1 specific immune responses in vivo and in vitro. *Blood*. 2010;115(1):151–3.
  153. Scholten KBJ, Kramer D, Kueter EWM, Graf M, Schoedl T, Meijer CJLM, u. a. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol*. 2006;119(2):135–45.
  154. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 2004;22(7):346–53.
  155. Grudzien-Nogalska E, Stepinski J, Jemielity J, Zuberek J, Stolarski R, Rhoads RE, u. a. Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCAs) and their applications in mRNA translation and stability. *Methods Enzymol*. 2007;431:203–27.
  156. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Historical Perspective Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463–7.
  157. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs, William B. I, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res*. 1976;36(12):4562–9.
  158. Banerjee C, Hiebert SW, Stein JL, Lian JB, Stein GS. An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4968–73.
  159. Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2014;1195:33–41.
  160. Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(9):3278–82.
  161. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980;209(4455):497–9.
  162. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56(3):344–50.
  163. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171–6.
  164. Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Bataille R, Van Riet I, Van Camp B, Omede P, u. a. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after. *Blood*. 1995;86(10):4001–2.
  165. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity*. 1994;1(7):595–606.
  166. Findley HW, Cooper MD, Kim TH, Alvarado C, Ragab AH. Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood*. 1982;60(6):1305–9.
  167. Benjamin D, Magrath IT, Maguire R, Janus C, Todd HD, Parsons RG. Immunoglobulin Secretion By Cell Lines Derived From African and American Undifferentiated Lymphomas of Burkitt ' S and Non-Burkitt ' S Type '. *J Immunol*. 1982;129(3):1336–42.
  168. Lozzio C, Lozzio BB. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With

- Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321–34.
169. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol*. 1984;133(1):123–8.
  170. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, u. a. Optimization of T-cell Reactivity by Exploiting TCR Chain Centricity for the Purpose of Safe and Effective Antitumor TCR Gene Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(9):1070–81.
  171. Gorer PA. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br J Cancer*. 1950;4(4):372–9.
  172. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*. 1975;35(1):218–24.
  173. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rößner S, Koch F, Romani N, u. a. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999;223(1):77–92.
  174. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261–7.
  175. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 1972;27(2):353–65.
  176. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. 1958;108(6):945–56.
  177. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981;23(1):175–82.
  178. Perantoni A, Berman JJ. Properties of Wilms' tumor line (TuWi) and pig kidney line (LLC-PK1) typical of normal kidney tubular epithelium. *In Vitro*. 1979;15(6):446–54.
  179. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231–8.
  180. Rols MP. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758(3):423–8.
  181. Yin L, Maben ZJ, Becerra A, Stern LJ. Evaluating the Role of HLA-DM in MHC Class II-Peptide Association Reactions. *J Immunol*. 2015;195(2):706–16.
  182. Van Lith M, McEwen-Smith RM, Benham AM. HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40800–8.
  183. Wölfel T, Hauer M, Klehmann E, Brichard V, Ackermann B, Knuth A, u. a. Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int J Cancer*. 1993;55(2):237–44.
  184. Voss R-H, Thomas S, Pfirschke C, Hauptrock B, Klobuch S, Kuball J, u. a. Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood*. 2010;115(25):5154–63.
  185. Fleischhauer K, Fernandez-Viña MA, Wang T, Haagensohn M, Battiwalla M, Baxter-Lowe LA, u. a. Risk associations between HLA-DPB1 T-cell epitope matching and outcome of unrelated hematopoietic cell transplantation are independent of HLA-DPA1. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(9):1176–83.
  186. Lauterbach N, Crivello P, Wieten L, Zito L, Groeneweg M, Voorter CEM, u. a. Allorecognition of HLA-DP by CD4+ T cells is affected by polymorphism in its

- alpha chain. *Mol Immunol*. 2014;59(1):19–29.
187. Stevanovic S, van Bergen CAM, van Luxemburg-Heijs SAP, van der Zouwen B, Jordanova ES, Kruisselbrink AB, u. a. HLA class II upregulation during viral infection leads to HLA-DP-directed graft-versus-host disease after CD4+ donor lymphocyte infusion. *Blood*. 2013;122(11):1963–73.
  188. Yang J, Huston L, Berger D, Danke NA, Liu AW, Disis ML, u. a. Expression of HLA-DP0401 molecules for identification of DP0401 restricted antigen specific T cells. *J Clin Immunol*. 2005;25(5):428–36.
  189. Guillaume P, Dojcinovic D, Luescher IF. Soluble tetrameric MHC/peptide complexes to identify and monitor tumor antigen-specific T cells. *Cancer Immun*. 2009;1(7):1235–47.
  190. Schultz ES, Schuler-Thurner B, Stroobant V, Jenne L, Berger TG, Thielemanns K, u. a. Functional Analysis of Tumor-Specific Th Cell Responses Detected in Melanoma Patients after Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *J Immunol*. 2004;172(2):1304–10.
  191. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(238):1–12.
  192. Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(296):1–10.
  193. Lauterbach N, Voorter CEM, Stallinga CMHA, Groeneweg M, Wieten L, Tilanus MGJ. Full-length HLA-DPB1 diversity in multiple alleles of individuals from Caucasian, Black, or Oriental origin. *Tissue Antigens*. 2012;79(3):165–73.
  194. Cesbron A, Moreau P, Milpied N, Harousseau JL, Muller JY, Bignon JD. Crucial role of the third and fourth hypervariable regions of HLA-DPB1 allelic sequences in the mixed lymphocyte reaction. *Hum Immunol*. 1992;33(3):202–7.
  195. Zino E, Vago L, Di Terlizzi S, Mazzi B, Zito L, Sironi E, u. a. Frequency and targeted detection of HLA-DPB1 T cell epitope disparities relevant in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(9):1031–40.
  196. Crivello P, Zito L, Sizzano F, Zino E, Maiers M, Mulder A, u. a. The impact of amino acid variability on alloreactivity defines a functional distance predictive of permissive HLA-DPB1 mismatches in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(2):233–41.
  197. Doorduijn EM, Sluijter M, Querido BJ, Oliveira CC, Achour A, Ossendorp F, u. a. TAP-independent self-peptides enhance T cell recognition of immune-escaped tumors. *J Clin Invest*. 2016;126(2):784–94.
  198. Jiang Y, Arase N, Kohyama M, Hirayasu K, Suenaga T, Jin H, u. a. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int Immunol*. 2013;25(4):235–46.
  199. Janković V, Remus K, Molano A, Nikolich-Zugich J. T cell recognition of an engineered MHC class I molecule: implications for peptide-independent alloreactivity. *J Immunol*. 2002;169(4):1887–92.
  200. Cohn M. Dissecting the two models of TCR structure-function relationships. *Immunol Res*. 2016;64(4):1–9.
  201. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J, u. a. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014;157(5):1073–87.
  202. Santori FR, Popmihajlov Z, Badovinac VP, Smith C, Radoja S, Harty JT, u. a.

- TCR Chain That Forms Peptide-Independent Alloreactive TCR Transfers Reduced Reactivity with Irrelevant Peptide/MHC Complex. *J Immunol.* 2007;178(10):6109–14.
203. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 1):5–15.
204. Nicholson MJ, Moradi B, Seth NP, Xing X, Cuny GD, Stein RL, et al. Small molecules that enhance the catalytic efficiency of HLA-DM. *J Immunol.* 2006;176(7):4208–20.
205. Fremont DH, Crawford F, Marrack P, Hendrickson WA, Kappler J. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity.* 1998;9(3):385–93.
206. Patronov A, Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. Peptide binding to HLA-DP proteins at pH 5.0 and pH 7.0: a quantitative molecular docking study. *BMC Struct Biol.* 2012;12:12–20.
207. Patronov A, Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. Peptide binding prediction for the human class II MHC allele HLA-DP2: a molecular docking approach. *BMC Struct Biol.* 2011;11(32):1–10.
208. Andreatta M, Nielsen M. Characterizing the binding motifs of 11 common human HLA-DP and HLA-DQ molecules using NNAlign. *Immunology.* 2012;136(3):306–11.
209. Lancaster C, Pristatsky P, Hoang VM, Casimiro DR, Schwartz RM, Rustandi R, et al. Characterization of N-glycosylation profiles from mammalian and insect cell derived chikungunya VLP. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1032:218–23.
210. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
211. Tahtinen S, Gronberg-Vaha-Koskela S, Lumen D, Merisalo-Soikkeli M, Siurala M, Airaksinen J, et al. Adenovirus improves the efficacy of adoptive T-cell therapy by recruiting immune cells to and promoting their activity at the tumor. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(8):915–25.
212. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 20:1–33.
213. Blank C. The perspective of immunotherapy: new molecules and new mechanisms of action in immune modulation. *Curr Opin Oncol.* 2014;26(2):204–14.
214. Singer K, Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):425–31.
215. Dustin ML. What counts in the immunological synapse? *Mol Cell.* 2014;54(2):255–62.
216. Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, Katovich Hurley C. Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. Population groups: Predominance of A\*02011 and identification of HLA-A\*0231. *Hum Immunol.* 2000;61(3):334–40.
217. Peinert S, Prince HM, Guru PM, Kershaw MH, Smyth MJ, Trapani JA, et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther.* 2010;17(5):678–86.
218. Fujiwara H, Ochi T, Ochi F, Miyazaki Y, Asai H, Narita M, et al. Antileukemia multifunctionality of CD4(+) T cells genetically engineered by HLA class I-restricted and WT1-specific T-cell receptor gene transfer. *Leukemia.* 2015;29(12):2393–401.

## Verzeichnisse

219. Geiger TL, Rubnitz JE. New approaches for the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Discov Med*. 2015;19(105):275–84.
220. Bollard CM, Barrett AJ. Cytotoxic T lymphocytes for leukemia and lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):565–9.
221. Svane IM, Verdegaal EM. Achievements and challenges of adoptive T cell therapy with tumor-infiltrating or blood-derived lymphocytes for metastatic melanoma: what is needed to achieve standard of care? *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(10):1081–91.
222. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, u. a. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014;124(2):188–96.
223. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):566–81.
224. Greco R, Oliveira G, Stanghellini MTL, Vago L, Bondanza A, Peccatori J, u. a. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol*. 2015;6(95).
225. van der Zouwen B, Kruisselbrink AB, Jordanova ES, Rutten CE, von dem Borne PA, Falkenburg JHF, u. a. Alloreactive Effector T Cells Require the Local Formation of a Proinflammatory Environment to Allow Crosstalk and High Avidity Interaction with Nonhematopoietic Tissues to Induce GVHD Reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(9):1353–67.
226. van Loenen MM, de Boer R, van Liempt E, Meij P, Jedema I, Falkenburg JHF, u. a. A Good Manufacturing Practice procedure to engineer donor virus-specific T cells into potent anti-leukemic effector cells. *Haematologica*. 2014;99(4):759–68.
227. Barrett DM, Zhao Y, Liu X, Jiang S, Carpenito C, Kalos M, u. a. Treatment of Advanced Leukemia in Mice with mRNA Engineered T Cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(12):1575–86.
228. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, u. a. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673–83.
229. Wang X, Chang WC, Wong CW, Colcher D, Sherman M, Ostberg JR, u. a. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011;118(5):1255–63.
230. Wu C-Y, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* (80- ). 2015;350(6258):aab4077.
231. Dörrschuck A, Schmidt A, Schnürer E, Glückmann M, Albrecht C, Wölfel C, u. a. CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes isolated from allogeneic healthy donors recognize HLA class Ia/Ib-associated renal carcinoma antigens with ubiquitous or restricted tissue expression. *Blood*. 2004;104(8):2591–9.

## 10 Beiträge zu Kongressen

Michael Zwerger, Sarah Vatter, Sebastian Klobuch, Mareile Siebörger, Carina Mirbeth, Wolfgang Herr, Simone Thomas: **HLA-DPB1 specific T-cell receptors as novel approach in adoptive immunotherapy of leukemias** - GvH/GvL-Meeting Regensburg 2016

## 11 Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Simone Thomas. Ihre Betreuung hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Unabhängig von Tageszeit und Wochentag hat sie E-Mails beantwortet und Ergebnisse sowie Ideen diskutiert. Sie hat die Arbeit durch viele Denkanstöße und Impulse in verschiedene Themenkomplexe gelenkt, was wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat und mich immer wieder zum weiteren Bearbeiten motiviert hat. Nicht zuletzt hat sie durch ihre wertvolle Kritik und Korrektur von Postern, Vorträgen und letztendlich meiner Dissertation dazu beigetragen, dass sie nun in dieser Form vorliegt.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Herr möchte ich herzlich für die Vergabe der Doktorarbeit danken. Seine Begeisterung für das Thema, die auf mich übergesprungen ist, hat sehr zu meiner Motivation beigetragen. Genauso möchte ich ihm für die Förderungen und die konstruktiven Treffen danken, die dem Projekt einen Roten Faden gegeben haben.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. rer. physiol. Maximilian Schmid, der mir mit hervorragendem Ratschlag zur Seite stand und bei der durchflusszytometrischen Messung der Proben immer noch einen Tipp hatte. Durch zahlreiche Diskussionen und das Korrekturlesen der Doktorarbeit hat er sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. med. Sebastian Klobuch bedanken, der mich in das Projekt eingearbeitet hat und mir gerade zu Beginn der Arbeit viel praktische Anleitung gegeben hat. Durch die Beantwortung so mancher Frage und der Beteiligung an Diskussionen hat er zum Konzept der Arbeit beigetragen.

Für ihre unersetzliche Hilfe danke ich Mareile Siebörger. Nur durch ihre gewissenhafte Einarbeitung war das Gelingen des Projektes überhaupt möglich. Während der zahlreichen Experimenten hat sie mich gerade in den aufwändigsten Phasen unterstützt und während der stressigen Studienzzeit die Peptidbeladungs- und Tierzelllinienexperimente durchgeführt. Mit ihrem unvergleichlichen Optimismus und ihrer Geduld hat sie immer wieder dafür gesorgt, dass ich mich motiviert dem Projekt widmen konnte. Carina Mirbeth möchte ich für die Hilfe bei sehr aufwändigen Experimenten, dem Einspringen, wenn der Zeitplan mal nicht aufging, und für die Einarbeitung danken.

Ich danke außerdem Sarah Vatter, die mich unter anderem in die Arbeit rund um den TZR<sub>11C12</sub> eingeführt hat und viel mitdiskutiert hat, sodass immer wieder neue Aspekte in die Arbeit einfließen konnten.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich auch der gesamten AG Thomas/ Herr aussprechen, die immer für ein tolles Arbeitsklima gesorgt haben. Dieses hat mich immer wieder aufs Neue motiviert.

Danke auch an meine Familie und an meine Freundin, die so manche stressige Zeit mit mir durchgestanden haben und mich immer unterstützt haben.