

Aus dem Lehrstuhl
für Gen-Immuntherapie
Prof. Dr. Hinrich Abken
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Charakterisierung eines HLA-DPB1*03:01-spezifischen T-Zell-Rezeptors für die
adoptive Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Neidlinger

2024

Aus dem Lehrstuhl
für Gen-Immuntherapie
Prof. Dr. Hinrich Abken
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Charakterisierung eines HLA-DPB1*03:01-spezifischen T-Zell-Rezeptors für die
adoptive Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Neidlinger

2024

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Simone Thomas
2. Berichterstatterin:	PD Dr. Anja Tröger
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2024

Inhalt

1	Einleitung.....	6
1.1	Die akute myeloische Leukämie.....	6
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	6
1.1.2	Klassifikationen	7
1.1.3	Therapie der akuten myeloischen Leukämie.....	9
1.2	Stammzelltransplantation als Therapieoption bei AML.....	10
1.2.1	Konditionierungstherapie bei allo-HSZT	10
1.2.2	Spenderauswahl bei allo-HSZT	11
1.2.3	Immunologische Reaktionen bei der allo-HSZT.....	12
1.3	Die Bedeutung der T-Zellen für die allo-HSZT	13
1.4	T-Zell-Immunologie	14
1.4.1	Der T-Zell-Rezeptor	14
1.4.2	Aktivierung einer T-Zelle	15
1.5	Adoptive T-Zell-Therapie.....	16
1.6	HLA-DPB1 als mögliches Zielantigen des GvL-Effekts	18
1.7	Generierung von HLA-DPB1 spezifischen T-Zellen	20
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialliste	22
2.1.1	Laborgeräte.....	22
2.1.2	Verbrauchsgüter	23
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.4	Antikörper.....	25
2.1.5	Kits.....	25
2.1.6	Medien und Zusätze	26
2.1.7	Zytokine	26
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	27
2.1.9	Desinfektionsmittel.....	27

2.1.10	Enzyme.....	27
2.1.11	Software.....	27
2.1.12	Verwendete T-Zell-Rezeptoren.....	28
2.1.13	Verwendete Plasmide.....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1	Transformation der Plasmid DNA.....	29
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	29
2.2.3	Linearisierung der DNA.....	29
2.2.4	Phenol-Chloroform-Aufreinigung der DNA.....	30
2.2.5	In-vitro-Transkription von mRNA.....	30
2.3	Zellkultur.....	31
2.3.1	Kulturbedingungen.....	31
2.3.2	Verwendete Zellen und deren Kulturbedingungen.....	32
2.4	Isolation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ positiven T-Zellen aus PBMC.....	34
2.5	Elektroporation.....	34
2.6	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie.....	35
2.7	IFN- γ -ELISpot.....	35
2.8	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest.....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Oberflächenexpression der beiden Varianten des 11G1-TZR.....	38
3.2	Kettenpaarungen zwischen 11G1-TZR und pp65-TZR.....	40
3.3	Funktionelle Charakterisierung der beiden α -Kettenvarianten.....	42
3.3.1	Erkennung verschiedener EBV-LCL.....	42
3.3.2	Erkennung primärer AML Blasten.....	44
3.4	Generierung eines chimären 11G1-TZR.....	46
3.5	Erkennung und Lyse primärer AML Blasten durch 11G1 _{chim} und 11G1 _{wt} -TZR	46
3.6	Reaktivität des 11G1 _{chim} und 11G1 _{wt} -TZR gegenüber nicht-hämatopoetischen Zellen.....	51
3.6.1	Fibroblasten.....	51
3.6.2	Humane und xenogene Zelllinien.....	53

3.7	Unterschiede zwischen IFN- γ -Behandlung und Elektroporation	56
3.7.1	Fibroblasten	56
3.7.2	Humane Zelllinien	59
4	Diskussion	62
4.1	Oberflächenexpression des 11G1-TZR.....	63
4.2	Vor- und Nachteile einer Murinisierung	64
4.3	Erkennung und Lyse von AML-Blasten	65
4.4	Reaktivität des 11G1-TZR gegen nicht-hämatopoetische Zellen	66
4.5	Vergleich der Methoden zur Induktion einer HLA-DP-Expression.....	67
4.6	Varianten zur Einbringung des T-Zellrezeptors in Zielzellen	68
4.7	Klinische Anwendung des 11G1-TZR	68
5	Zusammenfassung	70
6	Anhang	73
6.1	Abkürzungsverzeichnis	73
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	74
6.3	Tabellenverzeichnis.....	75
7	Literatur.....	76
8	Danksagung.....	85
9	Eidesstaatliche Erklärung	86

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Neoplasie der myeloischen Zellreihe. Es kommt zu einer pathologischen Proliferation klonaler, unreifer Vorläuferzellen, die ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben. Diese Zellen, die auch als Blasten bezeichnet werden, infiltrieren Blut, Knochenmark und andere Gewebe. Dadurch kommt es zu einer Insuffizienz der gesunden Hämatopoese, wodurch betroffene Patienten eine Zytopenie entwickeln. (1, 2)

Die klinischen Symptome sind meist eher unspezifisch und häufig Ausdruck einer Anämie, Neutropenie oder Thrombozytopenie. Dazu gehören vor allem Fatigue, Blutungserscheinungen, die Neigung zu Infektionen und Fieber. (3) Daneben kann es auch zu leukämischen Infiltrationen von extramedullärem Gewebe kommen. Die häufigsten Manifestationsorte sind Lymphknoten, Leber, Milz, Zahnfleisch, ZNS und Haut. (2)

Bei sehr hohen Leukozytenwerten (ab 100.000/ μ l) besteht die Gefahr eines Leukostasesyndroms mit okulären und cerebro-vaskulären Dysfunktionen oder Blutungen. (3)

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz der Erkrankung liegt in Deutschland bei ca. 3,5 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Etwa ein Viertel aller Leukämieerkrankungen entfällt auf die akute myeloische Form. (4) Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 70 Lebensjahren. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen an der akuten myeloischen Leukämie. (1, 5)

Zu den Risikofaktoren zählen unter anderem ionisierende Strahlung, Benzole und zytotoxische Chemotherapie. In den meisten Fällen entsteht eine AML allerdings *de novo*. (1) Erkrankungen, die mit einer Alkylanzien- oder Topoisomerase-II-Hemmer-Therapie assoziiert sind, treten typischerweise in einem charakteristischen zeitlichen Abstand nach der Chemotherapie auf und weisen typische Aberrationen auf. (6) Eine

AML kann auch aus einem myelodysplastischen Syndrom oder einer myelo-proliferativen Erkrankung hervorgehen. (4)

Eine erhöhte Inzidenz findet sich außerdem bei Patienten mit somatischen Chromosomenaberrationen, wie der Trisomie 21. Auch genetische Erkrankungen mit Störungen der DNA-Reparaturmechanismen, wie die Fanconi-Anämie, das Bloom-Syndrom oder die Ataxia teleangiectatica sind mit der akuten myeloischen Leukämie assoziiert. (7)

1.1.2 Klassifikationen

Zur Klassifikation der AML werden verschiedene Systeme verwendet. Die FAB-Einteilung von 1970 orientierte sich vor allem an morphologischen, immunphänotypischen und zytochemischen Kriterien. (8) Neue Erkenntnisse machten eine neue Art der Klassifizierung notwendig. Die aktuelle WHO-Klassifikation berücksichtigt auch genetische und klinische Faktoren. (9)

Tabelle 1: WHO-Einteilung der akuten myeloischen Leukämie (9)

AML mit definierenden genetischen Veränderungen

Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit PML::RARA-Fusion
AML mit RUNX1::RUNX1T1-Fusion
AML mit CBFβ::MYH11-Fusion
AML mit DEK::NUP214-Fusion
AML mit RBM15::MRTFA-Fusion
AML mit BCR::ABL1-Fusion
AML mit KMT2A-Rearrangement
AML mit MECOM-Rearrangement
AML mit NUP98-Rearrangement
AML mit NPM1-Mutation
AML mit CEBPA-Mutation
AML, Myelodysplasie-assoziiert
AML mit anderen definierenden genetischen Abberationen

AML, definiert nach Differenzierung

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute basophile Leukämie
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monozytäre Leukämie
- Akute erythroide Leukämie
- Akute megakaryozytäre Leukämie

Myeloisches Sarkom

AML nach zytotoxischer Therapie (AML-pCT)

Weiterhin kann die akute myeloische Leukämie auch nach dem Risikoprofil eingeteilt werden. Anhand der vorliegenden Aberrationen erfolgt eine Zuordnung zur günstigen, intermediären oder ungünstigen Risikogruppe. (10) Weitere Faktoren, die mit einer Prognoseverschlechterung einhergehen, sind das Patientenalter, ein schlechter Allgemeinzustand und hohe Leukozytenzahlen bei Diagnosestellung. (7)

Tabelle 2: Risikogruppen der AML nach European LeukemiaNet (ELN) (11)

<i>ELN Risikogruppe</i>	<i>Aberrationen</i>
Günstig	<ul style="list-style-type: none">t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITDbZIP in-frame mutiertes CEBPA
Intermediär	<ul style="list-style-type: none">Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITDWildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD (ohne ungünstige gen. Aberrationen)t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3::KMT2AZytogenetische Aberrationen, die weder als günstig oder ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	<ul style="list-style-type: none">t(6;9)(p23.3;q34.1); DEK::NUP214t(v;11q23.3); KMT2A-rearrangiertt(9;22)(q34.1;q11.2); BCR::ABL1t(8;16)(p11.2;p13.3); KAT6A::CREBBPinv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1), t(3q26.2;v), MECOM(EVI1)-rearrangiert-5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p)Komplexer Karyotyp (≥ 3 Aberrationen), monosomaler KaryotypMutation in ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, und/oder ZRSR2Mutiertes TP53

1.1.3 Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Die Therapie der AML gliedert sich grundsätzlich in eine Induktions- und eine Remissionstherapie. Vor der Einleitung einer Therapie sollte, sofern keine Indikation für eine notfallmäßige zytostatische Therapie besteht, eine ausführliche Diagnostik inklusive zyto- und molekulargenetischer Analysen stattfinden, sodass eine subgruppen-spezifische Therapie erfolgen kann. Weiterhin müssen bei der Therapieentscheidung das Alter, die Komorbiditäten und der Allgemeinzustand der Patienten mitberücksichtigt werden. (6, 12)

Patienten mit einem biologischen Alter bis 75 Jahre und ohne bzw. mit wenigen Begleiterkrankungen kommen für eine intensive, kurativ-intendierte Therapie in Frage. Zur Induktion kommt in der Regel das sogenannte 3+7 Schema zum Einsatz mit einer dreitägigen Gabe eines Antrazyklins (Daunorubicin, Idarubicin) und einer siebentägigen Cytarabin-Infusion. (3) Ziel der ersten Chemotherapie ist eine komplette Remission. Definitionsgemäß ist diese erreicht, wenn weniger als 5% Leukämieblasten im Knochenmark vorliegen und sich das Blutbild normalisiert hat (Neutrophile $\geq 1000/\mu\text{l}$ und Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$). Zusätzlich dürfen keine Auerstäbchen und keine extramedullären Manifestationen vorliegen. (6)

Ein alternatives Induktionsschema wird für Patienten verschiedener Subgruppen empfohlen.

Bei einer CD33-Positivität wird die Hinzunahme von Gemtuzumab/Ozogamicin (GO), einem Konjugat aus einem CD33-Antikörper und dem Zytotoxin Calicheamicin, zum ersten Zyklus einer Standard-Induktionstherapie mit 7+3 empfohlen. (13) Patienten mit FLT3-Mutation profitieren von einer Midostauringabe von Tag 8 bis Tag 21. (14)

Für Patienten der Subgruppen AML mit myelodysplastischen Veränderungen und therapieassoziiertes AML ist ein Überlebensvorteil für die Gabe von CPX-351 nachgewiesen. Bei CPX-351 handelt es sich um eine liposomale Formulierung von Cytarabin und Daunorubicin in einem festen Verhältnis, welche statt der klassischen Kombinationstherapie in dieser Patientengruppe eingesetzt wird. (15)

Als Remissionstherapie kommt entweder eine Konsolidierungs-Chemotherapie mit hoch/intermediär dosiertem Cytarabin oder eine allogene Stammzelltransplantation in

Frage. (2) Patienten mit einem geringeren Rezidivrisiko profitieren nicht von der Stammzelltransplantation. Bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko sollte eine allogene Stammzelltransplantation evaluiert werden. Für Patienten mit therapierefraktärer AML ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) die einzige kurative Therapieoption. (6, 16)

Bei älteren Patienten, mit einem biologischen Alter über 75 Jahren und/oder mit signifikanten Begleiterkrankungen, sollte angesichts hoher Toxizität und Frühsterblichkeit bei einer niedrigen Chance auf Langzeitremission keine intensive, kurativ intendierte Therapie durchgeführt werden. Neben einem Best-supportive-Care-Konzept kann diesen Patienten eine zytoreduktive Chemotherapie angeboten werden. Als Erstlinientherapie kommt bei dieser Patientengruppe der bcl-2-Inhibitor Venetoclax in Kombination mit 5-Azacitidin zum Einsatz. Liegt eine IDH1-mutierte AML vor, sollte eine Therapie mit dem IDH1-Inhibitor Ivosidenib und 5-Azacitidin durchgeführt werden, da in Studien für diese Kombination eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens der Patienten gezeigt werden konnte. Als Alternativen können andere hypomethylierende Substanzen wie Decitabin oder niedrigdosiertes Cytarabin eingesetzt werden (6)

1.2 Stammzelltransplantation als Therapieoption bei AML

Bei der Stammzelltransplantation können zwei verschiedene Formen unterschieden werden. Die autologe Stammzelltransplantation, bei der dem Patienten eigene Stammzellen infundiert werden, spielt bei der AML eine untergeordnete Rolle. (17) Diese Form der Transplantation dient einer schnelleren Rekonstitution der Hämatopoese nach knochenmarkstoxischen Behandlungen. (18) Bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-HSZT) vermitteln die im Transplantat enthaltenen Immunzellen zusätzlich einen therapeutischen Effekt. Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste Indikation für diese Form der Transplantation. (17)

1.2.1 Konditionierungstherapie bei allo-HSZT

Vor der allo-HSZT muss eine Konditionierungstherapie erfolgen, um die Patientenhämatopoese zu eliminieren und ein Anwachsen der Spenderstammzellen

zu ermöglichen. Bei der klassischen myeloablativen Konditionierung sollen auch möglichst viele Leukämieblasten eliminiert werden. Hierfür kann Cyclophosphamid mit einer Ganzkörperbestrahlung oder mit Busulfan kombiniert werden. (16) Neuere Therapieansätze rücken den anti-leukämischen Effekt der Spenderzellen mehr in den Mittelpunkt und setzen auf eine weniger aggressive Konditionierung. Verfahren mit reduzierter Intensität und nicht-myeloablative Konditionierungen sollen in erster Linie eine Transplantatabstoßung verhindern. Durch die bessere Verträglichkeit ermöglichen diese Strategien auch eine Stammzelltransplantation bei älteren Patienten, da die Toxizität der Konditionierung geringer ist. (19, 20)

1.2.2 Spenderauswahl bei allo-HSZT

Für die Auswahl eines geeigneten Stammzellspenders ist in erster Linie die immunologische Kompatibilität von Bedeutung. Hierbei spielen vor allem die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC für engl. major histocompatibility complex) eine Rolle. Beim Menschen werden diese Oberflächenmoleküle auch als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet. Sie werden grob in zwei Klassen eingeteilt. Zu den Klasse-I-Antigenen gehören HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie sind ubiquitär auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren CD8⁺ T-Zellen intrazelluläre Proteine in Form von Peptiden. HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR werden den Klasse-II-Antigenen zugeordnet. Sie sind überwiegend auf der Zelloberfläche von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC für engl. antigen presenting cells) vorhanden und interagieren mit CD4⁺ T-Zellen (17). Die Kombination aus den verschiedenen HLA-Molekülen macht die immunologische Identität eines Menschen aus. Dieses Muster ist höchst individuell und daraus ergibt sich die Komplexität der Spendersuche. (21, 22)

Unterschiede im HLA-Muster zwischen Spender und Patient haben große Auswirkungen auf den Erfolg einer Transplantation. Der aktuelle Goldstandard besteht in einem 10/10-Match. Dafür wird eine hochauflösende Typisierung der Genloci der HLA-A, -B und -C, sowie der HLA-DRB1 und -DRQ1-Antigenen durchgeführt und der beste Spender ermittelt. (23) HLA-DP wurde bei der Spenderauswahl bis vor wenigen Jahren nicht berücksichtigt.

Die HLA-Moleküle der Klasse II bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche gemeinsam die Peptidbindetasche zur Präsentation der Antigene bilden. Für das HLA-DP sind die entsprechenden Genloci (HLA-DP A1 und HLA-DP B1) auf dem Chromosom 6 lokalisiert. (24)

1.2.3 Immunologische Reaktionen bei der allo-HSZT

Allerdings kommt es auch bei einer guten HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Patienten häufig nach der allo-HSZT zu Komplikationen. Einerseits kann eine Host-versus-Graft-Reaktion stattfinden, was zur Transplantatabstoßung führt. Andererseits können die immunologisch kompetenten Zellen des Spenders, die im Transplantat vorhanden sind, die sogenannte Graft-versus-Host-Disease (GvHD) hervorrufen.

Man unterscheidet zwischen der akuten und der chronischen GvHD. In der Vergangenheit wurden alle Manifestationen, die innerhalb der ersten 100 Tagen nach der allo-HSZT auftraten als akut und alle späteren als chronisch definiert. (25) Die Kombination von klinischen Symptomen eignet sich allerdings besser zur Unterscheidung als der Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome. (26)

Die akute GvHD ist ein immun-getriggert Prozess, der zu einer tiefgreifenden Immundysregulation und Organdysfunktion führt und bereits wenige Tage nach der Transplantation auftreten kann. (25)

Symptome der aGvHD sind makulopapulöser Ausschlag und Pruritus. Bei Progredienz der Erkrankung kann es auch zu Erythrodermie und Blasenbildung kommen. Eine Beteiligung der Leber zeigt sich durch Hyperbilirubinämie und erhöhte Transaminasen. Im Gastrointestinaltrakt reichen die Komplikationen von Bauchschmerzen und Übelkeit bis hin zu blutigem Durchfall und paralytischem Ileus. Die GvH-Reaktion beeinträchtigt zusätzlich das Immunsystem, das durch die vorherige Therapie und den Krankheitsverlauf bereits eingeschränkt ist. Die Folge ist eine Anfälligkeit für Infektionen. (27)

Die chronische GvHD ist gekennzeichnet durch Verlust der Selbst-Toleranz und weist Ähnlichkeiten zu Autoimmunerkrankungen wie der Sklerodermie oder dem Sjögren-

Syndrom auf. (28) Oft kommt es zu entzündlichem Hautausschlag, Mundtrockenheit, sowie trockenen und empfindlichen Augen. (29)

Aber auch der Therapieeffekt der allo-HSZT lässt sich zu großen Teilen auf immunologische Reaktionen zwischen Spender- und Empfängerzellen zurückführen, die als Graft-versus-Tumor-Effekt bezeichnet werden. Im Rahmen der Leukämie spricht man auch vom Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL-Effekt). Die Immunzellen im Transplantat sind in der Lage maligne Zellen im Körper des Patienten zu erkennen und zu eliminieren. (30, 31)

Ohne Immunsuppression würden die meisten Patienten innerhalb eines Monats nach der Transplantation eine akute GVHD entwickeln. Wahrscheinlich folgen die GvL-Effekte einem ähnlichen zeitlichen Ablauf. (30)

Ziel der aktuellen Forschung ist es eine gezielte Stärkung des GvL- und einer Abschwächung des GvH-Effekt zu erreichen. (32, 33)

1.3 Die Bedeutung der T-Zellen für die allo-HSZT

Indizien für die besondere Rolle der T-Zellen für die allogene HSZT lieferten Untersuchungen mit T-Zell-depletierten Transplantaten. Es zeigte sich, dass sich durch eine Elimination der T-Zellen eine Reduktion des GvHD-Risikos erreichen ließ. Allerdings geschah dies auf Kosten einer höheren Leukämierate. (34, 35)

Es konnte gezeigt werden, dass der oben beschriebene GvL-Effekt vor allem von T-Zellen und von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) vermittelt wird. (30, 36) Transplantierte T-Zellen stellen zudem einen Schutz vor Infektionen dar. (35)

Der Erfolg der allo-HSZT beruht zu einem großen Teil auf der immunologischen Erkennung der malignen Zellen durch allogene T-Zellen. Dies zeigen auch klinische Studien mit reduzierter Konditionierungsintensität. (37)

Die transplantierten T-Zellen können eine Alloreaktivität gegen HLA-Moleküle oder Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHag) besitzen. (38) Als Minor-Histokompatibilitätsantigene werden immunogene Peptide bezeichnet, die sich von polymorphen intrazellulären Proteinen ableiten. Die genetische Grundlage für die

Entstehung der mHag sind Nukleotidpolymorphismen (SNP) im menschlichen Genom. Wenn SNP in der kodierenden Region eines Gens auftreten, können sie zum Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb eines Proteins führen. In den meisten Fällen wird die biologische Aktivität und Funktion des betreffenden Proteins nicht verändert, es kann aber zur Entstehung immunogener Peptide führen. Diese können, gebunden an HLA-Moleküle, von den transplantierten T-Zellen als fremd erkannt werden. (39) Weitere Zielstrukturen der transplantierten T-Zellen sind Leukämie-assoziierte bzw. Leukämie-spezifische Antigene wie beispielsweise Wilms-Tumor-1-Antigen (WT-1). Diese Antigene werden in leukämischen Blasten überexprimiert, liegen aber nicht oder kaum in gesunden Geweben vor. (40)

1.4 T-Zell-Immunologie

T-Zellen lassen sich grundsätzlich in zwei große Gruppen einteilen, die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die CD8⁺ T-Zellen sind überwiegend zytotoxische T-Zellen, die Peptide erkennen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Sie können in ihren Zielzellen die Apoptose auslösen. Zu den CD4⁺ T-Zellen zählen die T-Helferzellen, denen eine aktivierende Rolle bei der Immunantwort zukommt. Sie werden durch einen Komplex aus Peptid und MHC-Klasse-II-Molekül aktiviert. Auch die regulatorischen T-Zellen, die suppressive Zytokine ausschütten und damit anti-inflammatorisch wirken, gehören zu der Gruppe der CD4⁺ T-Zellen. (41)

1.4.1 Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) besteht aus zwei Ketten mit jeweils einer konstanten und einer variablen Domäne. Die Ketten sind in der T-Zell-Membran verankert und über eine Disulfidbrücke verknüpft. Bei etwa 95 % der T-Zellen im Blut wird dieser Antigenrezeptor aus einer α - und einer β -Kette gebildet, bei den anderen aus einer γ - und einer δ - Kette. (41) Auf der Zelloberfläche bindet der TZR an den CD3-Komplex, der aus den Proteinketten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ besteht und an die ζ -Kette bindet. Dabei handelt es sich um Signaluntereinheiten, die der Signalweiterleitung ins Zellinnere dienen. (24)

Jeder Mensch verfügt über eine enorme Vielfalt von T-Zell-Rezeptoren. Diese Vielfalt entsteht durch somatische Rekombination. Durch Umlagerung können Gensegmente

unterschiedlich verknüpft werden und so für die sehr große Diversität an Rezeptoren sorgen. (24) Die Rekombination und Expression der T-Zell-Rezeptoren findet im Thymus statt. Dort unterlaufen die Zellen im Anschluss einen Selektionsmechanismus. T-Zellen, die eine zu geringe Bindungsstärke zu MHC-Molekülen aufweisen, werden eliminiert. Aber auch T-Zellen, die Komplexe aus MHC und körpereigenen Peptiden so stark binden, dass die reifen T-Zellen dadurch aktiviert würden, werden durch Apoptose negativ selektiert, d. h. aussortiert. (41)

1.4.2 Aktivierung einer T-Zelle

Wie bereits geschildert, sind T-Zellen MHC-restringiert, das bedeutet, dass ihnen ihr Antigen im Kontext von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden muss. Wird ein TZR durch Bindung eines passenden Peptid-MHC-Komplex aktiviert, so wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer Aktivierung der T-Zelle führt.

Dabei kommt es zu einer Interaktion des TZR mit dem CD3-Komplex. An den intrazellulären Domänen des TZR befinden sich sogenannte Immunoglobulin-Tyrosin-Aktivierungsmotive (ITAM). Diese besitzen Tyrosingruppen, welche bei der Aktivierung phosphoryliert werden, sodass sie anschließend als Bindestellen für ZAP-70 zur Verfügung stehen. ZAP-70 kann dann wiederum das Gerüstprotein LAT phosphorylieren, wodurch es als Bindepartner für weitere Signalproteine zur Verfügung steht. Über weitere Schritte können so letztendlich unter anderem Transkriptionsfaktoren aktiviert, die zelluläre Stoffwechselwege hochreguliert und die durch Integrine vermittelte Zelladhäsion verstärkt werden. (24)

Für eine effiziente Reaktion der T-Zellen sind zudem die Ko-Rezeptoren CD4 bzw. CD8 von entscheidender Bedeutung. Sie gehen eine Bindung mit den nicht polymorphen Abschnitten des MHC-Moleküls ein, die entfernt von der Peptidbindungsstelle liegen. Die Ko-Rezeptoren sind in der Lage die T-Zell-Reaktion zu verstärken. (24)

1.5 Adoptive T-Zell-Therapie

Wie im letzten Kapitel bereits ausgeführt wurde, spielen T-Zellen eine wichtige Rolle in der immunologischen Überwachung und Tumoreradikation. In den letzten Jahrzehnten wurden neue Ansätze entwickelt, um diese Eigenschaften der T-Zellen für die Therapie von malignen Erkrankungen zu nutzen. (42) Bei der akuten myeloischen Leukämie spielen diese neuen Therapieoptionen vor allem für die Behandlung von Patienten mit Hoch-Risiko-AML oder Rezidiv eine Rolle, bei denen bisherige Therapiekonzepte oft ausgeschöpft sind. (43)

Eine Möglichkeit der Zell-basierten Immuntherapie stellt die Infusion von peripheren Lymphozyten des Stammzellspenders dar. Sie wird auch als DLI (donor lymphocyte infusion) bezeichnet. (43) Die Ergebnisse von DLI im Kontext der AML waren allerdings ernüchternd. Eine Remission konnte nur selten erreicht werden und bei vielen Patienten kam es zur GvHD oder eine bereits bestehende GvHD exazerbierte. (43–45)

Um den GvL-Effekt der T-Lymphozyten zu verstärken und gleichzeitig das GvHD-Risiko möglichst niedrig zu halten, besteht die Möglichkeit den Zellen eine definierte Spezifität zu verleihen. Dies kann durch das Einbringen von T-Zell-Rezeptoren geschehen, sodass die T-Lymphozyten HLA-abhängig definierte Antigene erkennen. Bei Kontakt mit dem spezifischen Antigen setzt eine T-Zell-Aktivierung ein und Tumorzellen können eliminiert werden. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die genetisch modifizierten Zellen *in vitro* in großen Mengen hergestellt werden können und anschließend dem Patienten infundiert werden können. (42)

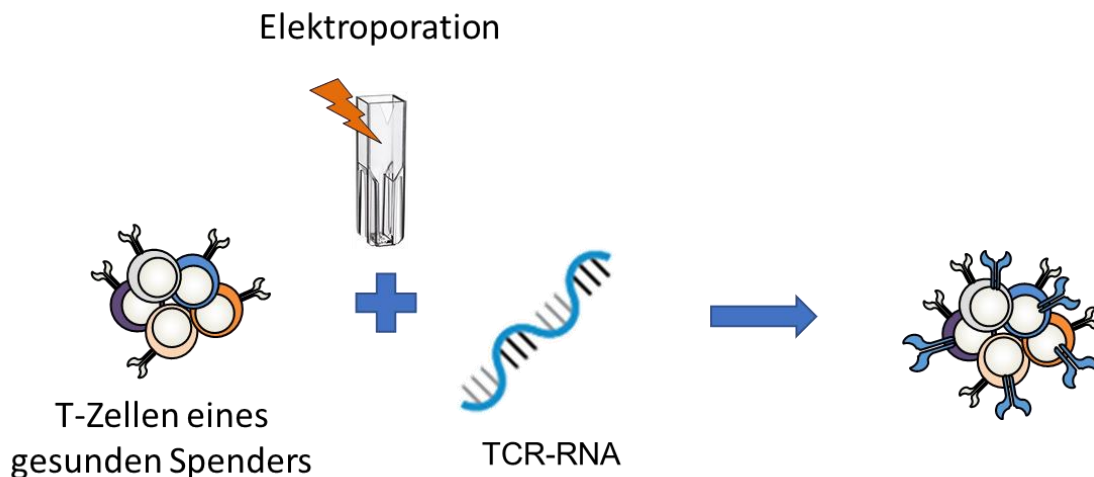


Abbildung 1: Schematische Darstellung der adoptiven TZR-Therapie

Aus antigen-spezifischen T-Zell-Klonen kann die TZR-Sequenz isoliert werden und anschließend in Spender T-Zellen eingebracht werden. Hierbei besteht die Möglichkeit den TZR über den Transfer von TZR-kodierender RNA mittels Elektroporation in die T-Zellen einzubringen. Dies führt zu einer transienten Expression des TZR an der Zelloberfläche.

Eine Expression eines anderen T-Zell-Rezeptors auf der T-Zelloberfläche kann transient durch Einbringung von RNA mittels Elektroporation oder stabil durch retro-/lentivirale Transduktion erreicht werden (Abb. 1).

Erste Erfolge konnten bei der Therapie des metastasierten malignen Melanoms erzielt werden. Der Einsatz von genetisch T-Zellen konnte eine Regression der malignen Zellen bei Patienten erreichen. (46)

Nebenwirkungen der adoptiven T-Zell-Therapie lassen sich in zwei Gruppen einteilen. On-target Nebenwirkungen können auftreten, wenn eine Expression des Target-Antigens auch auf gesunden Geweben und Organen vorliegt und diese durch den eingebrachten TZR erkannt und angegriffen werden. Als Off-target Nebenwirkungen waren Schäden an gesundem Gewebe oder Organen bezeichnet, die nicht das Target-Antigen des eingebrachten TZR aufweisen. Neben diesen Mechanismen kommt es auch durch die lympho-depletierende Behandlung im Rahmen der Präkonditionierung zu Gewebsschädigung. (47)

1.6 HLA-DPB1 als mögliches Zielantigen des GvL-Effekts

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von TZR-Therapien ist die Wahl eines geeigneten Antigens. Eine Struktur, die in den letzten Jahren in den Fokus rückte, ist das HLA-DPB1-Antigen.

In klinischen Studien konnten gezeigt werden, dass HLA-DPB1 Inkompatibilitäten bei allo-HSCT einen positiven Einfluss auf das Rezidivrisiko haben, aber das Risiko für schwere aGvHD-Ausprägungen steigern. (48–50)

Bei genaueren Analysen zeigte sich, dass sich verschiedene HLA-DPB1-Inkompatibilitäten unterschiedlich auf den klinischen Verlauf auswirken und zwischen permissiven und nicht-permissiven Inkompatibilitäten unterschieden werden muss. Permissive Inkompatibilitäten werden gut toleriert und hatten in Studien keine Auswirkungen auf das Gesamtüberleben. Die Rezidivrate war in der Gruppe mit HLA-DPB1-Inkompatibilitäten etwas geringer als in der Vergleichsgruppe. Nichtpermissive Inkompatibilitäten erhöhen die Gesamtmortalität und das Risiko für eine schwere GvHD. (51) Es wird vermutet, dass eine limitierte Alloreaktivität den GvL-Effekt vermittelt und aggressive Alloreaktivität zu einer klinisch nicht kontrollierbaren GvHD führt. (32)

Zur Erklärung der unterschiedlichen Effekte von permissiven und nicht-permissiven Inkompatibilitäten wurden zwei verschiedene Modelle entwickelt. Das Expressionsmodell wird von den Ergebnissen von Petersdorf und Kollegen gestützt. Sie konnten zeigen, dass bei Patienten, die eine höhere HLA-DP-Oberflächenexpression im Vergleich zum Spender aufweisen, das Risiko für eine GvHD erhöht ist. (52) Das T-Zell-Epitop-Modell teilt die verschiedenen HLA-DP-Allele nach Immunogenität in verschiedene Gruppen ein. (51, 53, 54)

Aufgrund der erniedrigten Rückfallrate bei Transplantationen mit HLA-DPB1-Inkompatibilität lässt sich vermuten, dass es sich beim HLA-DPB1-Antigen um eine potenzielle Zielstruktur für die adoptive T-Zelltherapie handeln könnte. (32)

Bei ungefähr 70-80% der unverwandten Spender liegt eine Inkompatibilität für HLA-DPB1 vor. (32) Bei Geschwisterspenden ist eine Inkompatibilität nur deutlich seltener (1-11%) zu erwarten. (32, 55, 56) Die Häufigkeiten der verschiedenen Allele in der

kaukasischen Bevölkerung werden in der Abbildung 2 gezeigt. Während für HLA-DPA1 in über 80% der betrachteten Population das 01:03 Allel vorliegt, ist die Variabilität bei HLA-DPB1 ausgeprägter. Am häufigsten kommt mit 44% 04:01 vor (04:02). Auch das HLA-DPB1 03:01 ist mit circa 10% vertreten.

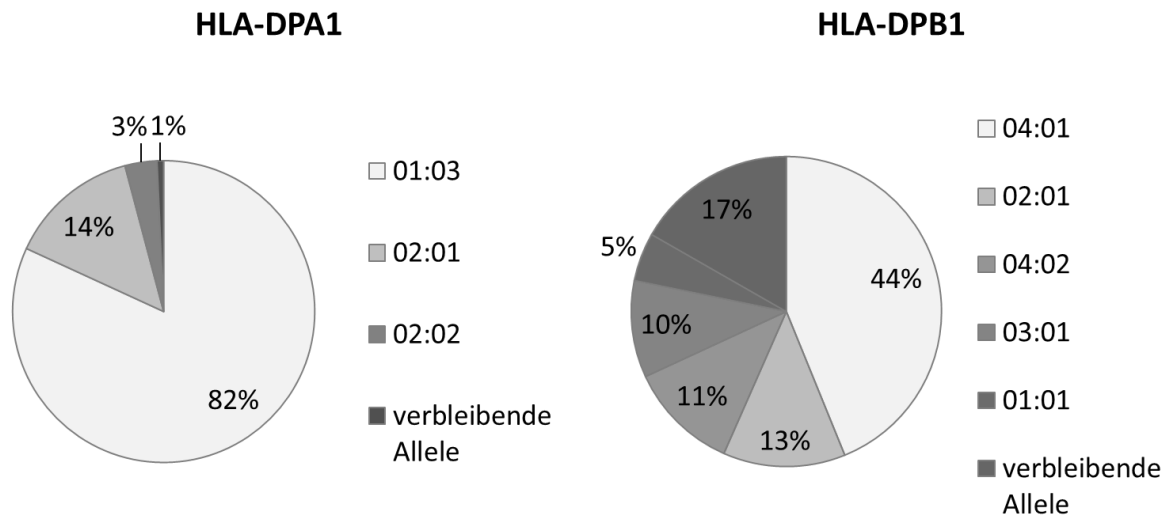


Abbildung 2: Frequenzen der HLA-DPA1 und HLA-DPB1-Allele in der kaukasischen Bevölkerung nach Hollenbach und Kollegen (57)

Als MHC-Klasse-II-Molekül ist HLA-DP unter nicht-inflammatorischen Bedingungen nur auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert. Bei entzündlichen Prozessen und der damit verbundenen Zytokinausschüttung kann eine HLA-DP-Expression auch auf anderen Körperzellen induziert werden. (58) Eine Therapie, die spezifisch auf das HLA-DPB1-Antigen abzielt, birgt deswegen auch die Gefahr unter inflammatorischen Bedingungen eine HLA-DP-gerichtete GvHD zu erzeugen oder zu verstärken (Abb. 3). (59)

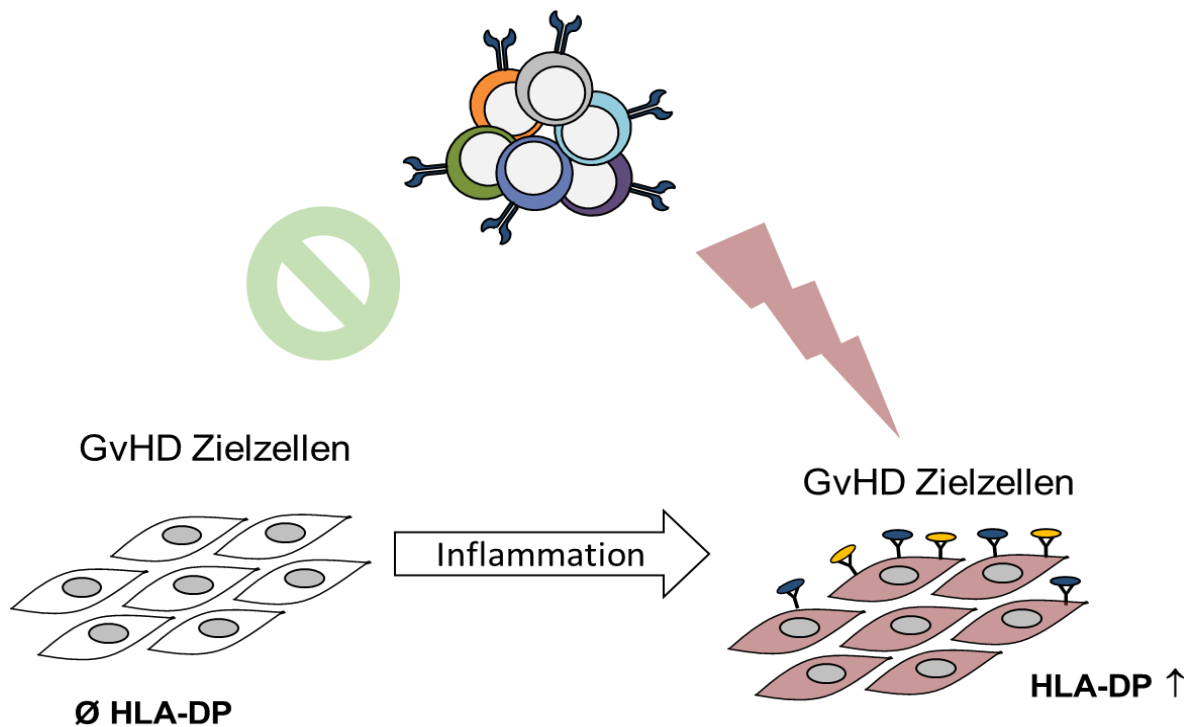


Abbildung 3: Induktion der HLA-DP-Expression bei Inflammation

Unter nicht inflammatorischen Bedingungen wird HLA-DP nicht auf GvHD-Zielzellen exprimiert. Durch Inflamationsprozesse kann jedoch eine Hochregulation von HLA-DP auf nicht-hämatopoetischen Zellen induziert werden. Das könnte zu einer T-Zell-vermittelten, HLA-DP-spezifischen Immunreaktion gegen diese Zellen führen.

1.7 Generierung von HLA-DPB1 spezifischen T-Zellen

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit der Generierung von HLA-DPB1-spezifischen T-Zellen. Dafür wurden naive $CD4^+$ Zellen mit autologen dendritischen Zellen, welche mit allogenen HLA-DP transfiziert wurden, kokultiviert. (60) Um eine $CD4^+$ -Korezeptorunabhängigkeit zu generieren, wurden die T-Zellen unter anderem mit einem $CD4^+$ blockierenden Antikörper inkubiert. Der Vorteil von korezeptor-unabhängigen TZR besteht darin, dass sie auch in $CD8^+$ T-Zellen funktionell sind. (61)

In den beschriebenen Stimulationskulturen konnte nach einigen Wochen unter anderem der HLA-DPB1*03:01 spezifische $CD4^+$ T-Zell-Klon 11G1 identifiziert werden. Dieser war in funktionellen Tests in der Lage AML-Blasten zu erkennen und zu lysieren. Außerdem zeigte er, unabhängig von inflammatorischen Bedingungen, keine Reaktivität gegen HLA-DPB1*03:01⁺ nicht-hämatopoetische Zellen. (62)

Diese Eigenschaften lassen vermuten, dass der TZR dieses Klons das Potential hat, einen GvL-Effekt mit geringem GvHD-Risiko zu vermitteln.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die allogene Stammzelltransplantation ist ein wichtiger Therapiepfiler der akuten myeloischen Leukämie. Schwerwiegende Nebenwirkungen und Leukämierückfälle limitieren allerdings die Erfolge. Das Ziel der Forschung ist es, eine Trennung von GvL und GvH-Effekt zu erreichen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein HLA-DPB1*03:01 spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klon isoliert. Die bisherigen Experimente mit diesem Rezeptor ließen eine Hämatopoese-Spezifität vermuten, was ein reduziertes Nebenwirkungsprofil erwarten lässt. (62, 63)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den T-Zell-Rezeptor dieses HLA-DPB1*03:01 spezifischen Klons, der im Folgenden als 11G1-TZR bezeichnet wird, genauer zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf der Analyse der Reaktivität des 11G1-TZR gegen hämatopoetischen Zellen (in erster Linie primäre AML-Blasten) und gegen nicht-hämatopoetische GvHD-Modellzellen.

Die DNA des 11G1-TZR wurde bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe isoliert und zur späteren mRNA-Herstellung in den Expressionsvektor pGEM4Z-64A kloniert. Es wurden zwei verschiedene Gensequenzen für die α -Kette gefunden. Im ersten Schritt sollte die funktionelle Variante der α -Kette identifiziert und das Expressionsverhalten des 11G1-TZR untersucht werden. Für die anschließende funktionelle Charakterisierung wurde die Erkennung von EBV-transformierten B-Zellen (EBV-LCL) und primären AML-Blasten analysiert. Um eine Erhöhung der TZR-Expression zu erreichen, wurde der 11G1-TZR murinisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Funktionstestungen mit dem murinisierten Rezeptor wiederholt und zusätzlich Lyse-Tests durchgeführt. Als GvHD-Modellzelllinien kamen Fibroblasten und weitere humane und xenogene Zelllinien zum Einsatz. Nach der Induktion einer HLA-DP-Oberflächenexpression konnte die Reaktivität des 11G1-TZR gegen nicht-hämatopoetische Zellen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Laborgeräte

Abzug Typ TAN 120	Prutscher Laboratory Systems, AT
Autoklav Dampfsterilisator Typ 75 S	HP Medizintechnik GmbH, DE
BD FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, DE
C.T.L. ELISpot Reader	Cellular Technology Limited, USA
Computer Power Mac G4	Apple, USA
Einfrierbox cryo safe	neoLab Migge GmbH, DE
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, DE
Gefrierschrank Forma 900 series -80°C	Thermo Fischer
Gene Pulsar Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Inkubationsschrank Heracell 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Fischer Scientific, USA
Laborspülautomat G7783 CD	Miele & Cie. KG, DE
MACS MultiStand	Milteny Biotech GmbH, DE
Membranvakuumpumpe (VP 86)	VWR International, USA
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, DE
Milli-Q Q-Pod®	Merck Milipore, USA
Reinstwasseraufbereitungsanlage	
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, USA
Netzgerät EV231	Consort GmbH, BEL
Pipetboy 2	Integra Biosciences AG, US
Pipetten	
Ergo One	Starlab GmbH, DE
Ergo One Mehrkanalpipette	
Research Plus	Eppendorf AG, DE
Präzisionswaage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, DE
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, USA
Stickstofftank HEco Series 800-190	Chart MVE BioMedical, USA

ThermoMixer C	Eppendorf AG, DE
Typhoon 9200	GE Healthcare, UK
Vortex VV3	VWR International, USA
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, CH
Wärmebad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, DE
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (5424 R)	Eppendorf AG, DE
Heraeus Megafuge (16R)	Thermo Fischer Scientific, USA
Heraeus Megafuge (40R)	Thermo Fischer Scientific, USA
Mikrozentrifuge (C1301B-230V)	Labnet, USA
Standzentrifuge Sorvall RC 6 Plus mit Rotor SA-512	Thermo Fischer Scientific, USA

2.1.2 Verbrauchsgüter

Cellstar Centrifuge Tubes 15/50 ml	Greiner bio one GmbH, AT
Elektroporationsküvetten (4mm)	Biolabproducts GmbH, DE
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, DE
Handschuhe	
Nitrilhandschuhe	Halyard, USA
Versa Touch Handschuhe	Ansell, AT
Kryotubes	Greiner bio one GmbH, AT
MACS PreSparation Filter	MiltenyiBiotech GmbH, DE
MACS Separation Columns LS	MiltenyiBiotech GmbH, DE
MultiScreen HTS Filter Plates	Merck Milipore, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Petrischalen	Greiner bio one GmbH, AT
Pipettenspitzen	
Tip One:	Starlab GmbH, DE
10/20/100/200/1000 µl	
20/100/200/1000 µl (gestopft)	
Safe Seal Tips 10 µl (gestopft)	Biozym, DE

Reaktionsgefäße Safe Lock Tubes 0,2/0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf AG, DE
Sterilfiltereinheiten Steri Cup quick release	Merck Milipore, USA
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH, DE
Zellkulturflaschen Cellstar T25/50/75	Greiner bio one GmbH, AT
Zellkulturplatten Cellstar 6/12/24/96 well	Greiner bio one GmbH, AT

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol	Carl Roth GmbH, DE
3-Amino-9-ethyl-carbazol	Sigma-Aldrich, USA
Agarose	Carl Roth GmbH, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, USA
CutSmart Puffer	New England Biolab, USA
EDTA	Carl Roth GmbH, DE
Essigsäure	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol >99,8%	Carl Roth GmbH, DE
FACS Clean Solution	BD Biosciences GmbH, DE
FACS Flow Sheat Fluid	BD Biosciences GmbH, DE
FACS Rinse	BD Biosciences GmbH, DE
Na-Acetat 3M	Invitrogen by ThermoFisher
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco by Life Technologies, USA
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau	Carl Roth GmbH, DE
Tween 20	Applichem, DE
UltraPure™ DNase/RNase freies H ₂ O dest.	Life Technologies, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich®, USA

2.1.4 Antikörper

ELISpot Antikörper

Anti-human Interferon-mAB 7-B6-1-Biotin	Mabtech, SWE
Anti-human Interferon- mAB (Capture Ab)	Mabtech, SWE

Antikörper für Durchflusszytometrie

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Konz.</i> <i>in μl/2x10⁵ Zellen</i>	
Anti-Human HLA-DP	B7/21	5	Leinco Technologies, Inc., USA
Goat-Anti-Mouse IgG Fc-FITC (gam-FITC)		3	Thermo Fischer Scientific, USA
Mouse-Anti-Human TCR α/β PE	T10B9.1A- 31	2	Becton Dickinson GmbH, DE
Anti-Human TCR V β 13.2 PE	H132	2,5	Beckman Coulter, USA
Anti-Mouse TCR β PE	H57-597	2,5	BD Biosciences GmbH, DE
CD3 APC	UCHT1	2,5	BD Biosciences GmbH, DE
CD4 APC	RPA-T4	1	BD Biosciences GmbH, DE
CD8 APC	RPA-T8	1	BD Biosciences GmbH, DE

2.1.5 Kits

mMESSAGE T7 Ultra Kit	Ambion, USA
QIAfilter® Midi Prep Kit	QIAGEN, DE
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, DE
RNEasy Mini Kit	QIAGEN, DE
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, CAN
Dynabeads Human T-Activator CD3/28	MiltenyiBiotec GmbH, DE

2.1.6 Medien und Zusätze

AIM V	Gibco® by Life Technologies, USA
DMEM	Gibco® by Life Technologies, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, DE
Hepes Buffer (1M)	Sigma-Aldrich®, USA
Humanes Serum (HS)	Blutspendedienst des DRK gemeinnützige GmbH, DE
L-Glutamin	Gibco® by Life Technologies, USA
Opti-MEM	Gibco® by Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco® by Life Technologies, USA
RPMI 1640	Gibco® by Life Technologies, USA
Trypsin 0,05% - EDTA	Thermo Fischer Scientific, USA

Selbsthergestellte Medien

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

2.1.7 Zytokine

rh-IL-2	Novartis AG, CH
rh-IL-7	R&D Systems, Inc., USA
rh-IL-15	PeproTech, USA
rh-IFN- γ	eBioscience, USA

2.1.8 Puffer und Lösungen

MACS-Puffer	500 ml PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
FACS-Fixans	PBS + 1% Formaldehyd

2.1.9 Desinfektionsmittel

Waschlotion Manisoft	Ecolab® Inc., USA
Händedesinfektionslösung Sterilium Classic	Bode Chemie GmbH, DE
Incindin Plus	Ecolab® Inc., USA

2.1.10 Enzyme

Spe I	New England BioLabs Inc., USA
XbaI	New England BioLabs Inc., USA
XhoI	New England BioLabs Inc., USA

2.1.11 Software

CellQuest Pro	BD Biosciences GmbH, DE
Clone Manager 9	Scientific and Educational Software, USA
FlowJo v10.1	FlowJo LLC, USA
GraphPad Prism Version 7	GraphPad Software Inc., USA
ImmunoSpot	C.T.L., USA
ImmunoCapture	C.T.L., USA

2.1.12 Verwendete T-Zell-Rezeptoren

TZR	Spezifität	Murinisierung	Quelle
11G1 _{wt}	HLA-DP*03:01	nein	(61, 63)
11G1 _{chim}	HLA-DP*03:01	ja	(61, 63)
11C12	HLA-DP*04:01	ja	(60, 63)
pp65	Hum. CMV	ja	(64)

2.1.13 Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle
pGEM4Z-64A	(65)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation der Plasmid DNA

Um Fremd-DNA in E. coli Bakterien einzubringen, wurden JM109 E. coli mittels Hitzeschockverfahren transformiert. Durch den Hitzeschock bilden sich Poren in der Zellmembran der chemisch kompetenten Bakterien durch die DNA in die Zelle eindringen kann. Hierzu wurden pro Ansatz 100µl kompetente Bakterien auf Eis angetaut und 1µg DNA aus bereits vorliegenden Mini-Präparationen zugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden erfolgte. Die Bakterien wurden erneut für eine Minute auf Eis inkubiert, bevor sie mit 1ml LB-Medium vermischt und für 40 Minuten (JM109) bei 37°C und 280 UpM geschüttelt wurden. Es wurden 50µl des Bakterien-Ansatzes auf einer LB Amp^(0,1 mg/ml)-Agaroseplatte ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch die Zugabe des Antibiotikums konnten sich nur Kolonien aus den Bakterien bilden, die den Vektor mit Insert aufgenommen hatten, da der pGEM-4Z-64A-Vektor eine Ampicillinresistenz enthält.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Am nächsten Tag wurden aus den gewachsenen Kolonien Klone für eine weitere Kultur ausgewählt. Die Vervielfältigung erfolgte auf Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmedium (c=100µg/ml) über Nacht bei 37°C und 280 UpM. Für die Midi-Prep wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN QIAfilter Plasmid Midi Prep Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Die durchgeführten Mini-Präparationen wurden ebenfalls mit einem Kit der Firma QIAGEN durchgeführt. In beiden Fällen fand zunächst eine alkalische Lyse der Bakterienzellen statt. Die dadurch freigewordene DNA adsorbierte bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagel-Säule. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA aus der Säule wieder eluiert werden.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit einem Spektralphotometer gemessen und die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3 Linearisierung der DNA

Für die *in-vitro*-Transkription muss die Plasmid-DNA linearisiert vorliegen, damit die im mMESSAGE T7 Ultra Kit enthaltene RNA-Polymerase die DNA ablesen kann. Dazu

wurde die Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease Spe-I bei 37°C über Nacht verdaut.

2.2.4 Phenol-Chloroform-Aufreinigung der DNA

Nach der Linearisierung wurde eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung zur Entfernung von Proteinen und Salzen durchgeführt, welche die *in-vitro*-RNA-Transkription behindern können. Dazu wurde der Ansatz auf 400µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend mit 400µl Phenol, Chloroform und Isoamyalkohol versetzt und intensiv gemischt. Um eine Phasentrennung zu Erreichen wurde das Gemisch bei 15000 UpM für fünf Minuten zentrifugiert. Die untere organische Phase mit den darin enthaltenen denaturierten Proteinen wurde verworfen. Die obere Phase, in der sich die DNA befand, wurde nun wiederum mit 400µl Phenol, Chloroform und Isoamyalkohol versetzt. Das oben beschriebene Prozedere wurde insgesamt fünfmal durchgeführt und anschließend noch fünfmal nur mit Chloroform wiederholt. Nach den Waschschritten wurde zur wässrigen, DNA-enhaltenden Phase Natriumacetat und Ethanol zugegeben. Durch Lagerung bei -20°C für 2 Stunden erfolgte eine Präzipitation. Die ausgefallene DNA konnte nun mit Ethanol gewaschen und für 30 Minuten bei 15000 UpM und 4°C zentrifugiert werden. Nach kurzer Trocknung wurde das DNA-Pellet in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.5 In-vitro-Transkription von mRNA

Zur *in-vitro*-Synthese von mRNA für die anschließende Elektroporation wurde das mMessage mMachine® T7 Ultra Kit verwendet. Die hier verwendete T7-RNA-Polymerase wird durch den passenden Promotor auf dem pGEM4Z-64A-Vektor aktiviert. Bei der verwendeten Methode kommt ein modifiziertes Cap-Analogen (ARCA) zum Einsatz was die Ausbeute an funktioneller mRNA erhöht. Außerdem sorgt ein Poly-A-Schwanz für eine erhöhte Stabilität des Endprodukts.

Die Synthese erfolgte weitestgehend nach Herstellerangaben. Lediglich die Inkubationszeit beim Anfügen des ARCA an das 5'-Ende wurde auf drei Stunden verlängert und für die 3'-Polyadenylierung wurde der Ansatz eine Stunde inkubiert.

Danach wurden 700µl RLT-Puffer und 500µl Ethanol zugegeben und es erfolgte eine Aufreinigung des Reaktionsgemisches mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Die RNA wurde

schließlich mit 50µl RNase freiem Wasser eluiert. Einzelne RNase freie Reaktionsgefäße mit je 10µg RNA wurden bei -80°C gelagert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Atmosphäre kultiviert.

Als Standardkulturmedium (z.B. für LCL, Jurkat76) wurde RPMI 1640 mit Phenolrot eingesetzt. Für die Kultivierung der Fibroblasten wurde DMEM verwendet. Beiden Medien wurden L-Glutamin, Hepes, Penicillin/Streptomycin sowie 10% FCS zugesetzt. Adhärenz Zellen wurden bei Bedarf erst mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert, wobei das enthaltene FCS das Trypsin inaktivierte. Die Zellen wurden bei 1500 UpM für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend erneut ausgesät. Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in den in Tabelle 3 aufgeführten Kulturmedien kultiviert und je nach Zelldichte ca. zweimal pro Woche gesplittet.

Primäre AML-Blasten wurden am Abend vor dem eigentlichen Versuchstag aufgetaut und in AIM V + 10% HS ausgesät.

2.3.2 Verwendete Zellen und deren Kulturbedingungen

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung der Zellen	Kulturmedium
Jurkat76	Humane T-ALL ohne endogenen T-Zell Rezeptor	RPMI 1640 + 10 % FCS
LCL	Mit EBV immortalisierte humane B-Zellen aus PBMC	RPMI 1640 + 10 % FCS
Primäre AML Blasten	Blastenbank UKR	AIM V + 10 % HS
Primäre Fibroblasten	Initial aus Präputium gewonnen	DMEM + 10 % FCS
Sw480	Humanes Kolonkarzinom, Duke B	DMEM + 10 % FCS
Sk29mel	Humanes, malignes Melanom	DMEM + 10 % FCS
Saos-2	Humanes Osteosarkom	DMEM + 10 % FCS
Cos-7	Grüne Meerkatze, Nierenzellen	DMEM + 10 % FCS
Sk5mel	Humanes malignes Melanom	DMEM + 10 % FCS
HCT116	Humanes Kolonkarzinom	DMEM + 10 % FCS

Übersicht über Spenderzellen und HLA-DP Typisierungen

Tabelle 4: Verwendete PBMC

Spender	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
124	01:01/03:01	08:01/15:17
140	02:01	01:01/14:01
149	02:01	05:01/17:01
197	01:03	02:01/26:01
199	02:01	05:01/17:01
216	01:03	02:01/04:01
232	02:01/01:03	01:01/02:01
234	01:03/02:01	02:01/14:01

Tabelle 5: Verwendete EBV-LCL

Spendernummer	HLA-DPB1*
LCL 205	03:01/06:01
LCL 237	02:01/04:01
LCL 285	03:01/04:02

Tabelle 6: Verwendete AML-Blasten

Spendernummer	Diagnose	HLA-DPA1*	HLA-DPB1*
AML 002	AML-M4	01:03	03:01/04:01
AML 006	AML (Rezidiv)	01:03/02:01	02:01/09:01
AML 008	AML	01:03	03:01
AML 121	AML-M2 Progress	01:03	03:01/04:01

Tabelle 7: Verwendete Fibroblasten

Spendernummer	HLA-DPB1*
Fb 17	02:01/03:01
Fb 19	03:01/04:01
Fb 22	04:01/04:02
Fb 29	04:01/03:01

2.4 Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ positiven T-Zellen aus PBMC

Die Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ positiven T-Zellen erfolgte durch magnetische Zellsortierung aus eingefrorenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Je nach benötigter Menge an T-Zellen wurden PBMC aufgetaut, wobei davon ausgegangen wurde, dass ca. 10% bzw. 20% der PBMC auf CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen entfallen. Die Zellen wurden mit PBS zur Entfernung des Einfriermediums gewaschen und danach gezählt. Auf 10 Millionen T-Zellen wurden 20µl CD4⁺- bzw. CD8⁺-beads eingesetzt und die vierfache Menge an MACS-Puffer zugegeben. Während der Inkubation bei 4°C für 20 Minuten konnten die Magnetpartikel, die an CD4⁺- oder CD8⁺-Antikörper gekoppelt sind, spezifisch an die gewünschte T-Zell-Population binden. Danach wurden die ungebundenen Beads ausgewaschen und die Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500µl MACS-Puffer resuspendiert und über einen Pre-Separation-Filter auf die bereits equilibrierte LS-Säule im Magnetständer aufgetragen. Die markierten Zellen verblieben dabei in der Säule, während alle anderen Zellen durch drei Waschschrte mit 3ml MACS-Puffer ausgewaschen wurden. Die Elution der T-Zellen erfolgte mit 10ml Puffer durch Druck auf den Kolben der LS-Säule. Die isolierten Zellen wurden gezählt, gewaschen und auf 1,0 Mio Zellen/ml in AIM V mit 10% Humanserum auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Anschließend erfolgte eine Stimulation (siehe Tabelle).

CD3/28 beads	5 µl pro 1 Mio Zellen
IL-2	100 U/ml
IL-7	5ng/ml
IL-15	5ng/ml

Die T-Zellen wurden vor der Elektroporation für sieben bis zehn Tage kultiviert und dabei regelmäßig gesplittet.

2.5 Elektroporation

Zur Einbringung von RNA in Zielzellen wurden diese einem Strompuls ausgesetzt. Dabei wurde die Zellmembran kurzzeitig permeabel und die RNA konnte in das Innere der Zellen gelangen. So konnte eine transiente Oberflächenexpression von verschiedenen T-Zell-Rezeptoren oder HLA-DP-Molekülen erreicht werden. Pro Ansatz wurden 5 Millionen Zellen verwendet, die erst mit RPMI farblos und dann mit OptiMem gewaschen wurden. Bei der Zentrifugation wurde eine langsamere

Umdrehungszahl von 1000 UpM gewählt und die Zellen wurden sehr vorsichtig resuspendiert, um die Zellen möglichst wenig zu schädigen. Zur Elektroporation wurde die Zellsuspension in eine Küvette (4mm) überführt, in der bereits RNA (10µg pro TZR- bzw. HLA-DP-Kette) vorgelegt wurde. Dann wurde ein Rechteck-Puls mit 500 Volt (T-Zellen) bzw. 400 Volt (Zelllinien) abgegeben. Anschließend wurden die Zellen in ihr Kulturmedium überführt.

2.6 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie

Um die Oberflächenexpression der T-Zellrezeptoren bzw. des HLA-DP zu analysieren, wurden die Zellen mittels fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS) untersucht.

Dabei binden Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, spezifisch an das zu untersuchende Antigen auf den Zellen. Durch Anregung der Farbstoffe, emittieren diese Licht, woraus Rückschlüsse auf die Expressionsdichte des Antigens gezogen werden können.

Zur Analyse wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Messung verwendet. Vor der Färbung wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen. Zum Zellpellet wurden dann konjugierte oder unkonjugierte monoklonale Antikörper (AK) gegeben. Die Bindung an das Antigen erfolgte während einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden überschüssige AK durch einen erneuten Waschschrift entfernt. Im Falle des unkonjugierten AK B7-21 wurde im zweiten Schritt eine sekundäre Färbung mit mAb-goat-anti-mouse-FITC durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden in 200µl FACS Fixans Puffer resuspendiert. Als Messgerät diente der BD FACS Calibur und zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo verwendet.

Die bei einigen Versuchen mitangegebene relative mediane Fluoreszenzintensität (rMFI) ist bestimmt als Quotient der MFI der Probe und der MFI der Mock-Kontrolle.

2.7 IFN-γ-ELISpot

Um die Erkennung der elektroporierten Zellen zu untersuchen, wurden IFN-γ ELISpots durchgeführt. Dabei kam eine 96-Loch-Platte mit einer Polyvinylidenfluorid Membran zum Einsatz. Diese wurde mit 35% Ethanol behandelt und anschließend mit dem anti-human-IFN-γ1-D1K Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei wurde der AK durch Bindung an die Membran immobilisiert. Am nächsten Tag wurden nicht

gebundene Antikörper durch drei Waschschrirte mit PBS entfernt und unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation mit AIMV + 10% HS blockiert.

Schließlich konnte eine Kokultur von Effektor und Zielzellen angesetzt werden. Das Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis wurde je nach Versuchsbedingungen möglichst passend gewählt und ist bei den einzelnen Versuchen mit angegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden, in denen die T-Zellen je nach Aktivierung IFN- γ ausschütteten, wurden die Zellen verworfen und die Platte sechsmal mit PBS+0,05% Tween gewaschen. Es folgte die Zugabe des Zweitantikörpers anti-human-IFN- γ -7-B6-1-Biotin, welcher an IFN- γ bindet. Nach zwei Stunden erfolgten noch einmal die oben genannten Waschschrirte. An den mit Biotin ausgestatteten Antikörper wurde nun eine Mischung vorinkubierter Peroxidase mit Streptavidin gebunden. Schließlich wurde die Platte noch dreimal mit PBS + 0,05% Tween und dreimal mit reinem PBS gewaschen. Durch eine Färbereaktion mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Lösung (AEC-Lösung) und 0,03% H₂O₂, konnte freigesetztes IFN- γ sichtbar gemacht werden. Die entstandenen roten Spots wurden mit dem C.T.L ELISpot Reader ausgezählt.

2.8 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von T-Zellen gegen AML-Blasten, wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Zielzellen chromiert und für einen definierten Zeitraum mit verschiedenen T-Zellen kokultiviert. Um die Zielzellen radioaktiv zu markieren, wurden sie in 50µl FCS mit 100µCi ⁵¹Chrom 120 Minuten lang inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit RPMI farblos gewaschen und 1.500 Zellen in 80µl RPMI farblos mit HS oder FCS in je eine Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte ausgesät. Hierzu wurden T-Zellen in einem bestimmten Effektor-Zielzell-Verhältnis in 80µl des gleichen Mediums zugegeben. Als Referenz wurden Werte für die Minimal- und Maximallyse bestimmt. Dazu wurden 80µl Medium bzw. 80µl 2% Tween zu den chromierten Zellen gegeben. Nach einer fünfstündigen Inkubationszeit wurden die Platten für fünf Minuten bei 1.000 Upm ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurden 80µl des Überstandes auf eine 96-Loch LumaPlate überführt. Mit Hilfe der LumaPlate war es möglich die freigesetzte γ-Strahlung zu messen. Dazu wurde die LumaPlate über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit dem Topcount@NXTTM die ⁵¹Chrom-Freisetzung bestimmt. Der prozentuale Anteil lysierender T-Zellen berechnet sich aus der folgenden Formel:

$$\frac{(\text{experimentell ermittelter Wert} - \text{Minimallyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Minimallyse})} \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]}$$

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächenexpression der beiden Varianten des 11G1-TZR

Bei der Isolierung der TZR-DNA aus dem in Abschnitt 1.7 erwähnten 11G1 T-Zell-Klon wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine β -Kette ($V\beta$ 13.2) sowie zwei verschiedene Varianten der α -Kette identifiziert. Das erste Ziel war es herauszufinden, ob es sich bei der α_{8-3} -Kette oder bei der α_{13-2} -Kette um die funktionelle Variante handelt. Hierzu wurden TZR-negative Jurkat76-Zellen mit 11G1-TZR kodierender IVT-RNA und zur Kontrolle auch mit der TZR_{11C12} IVT-RNA bzw. ohne RNA (Mock) elektroporiert. Beim TZR_{11C12} handelt es sich um einen bereits genauer untersuchten HLA DP*04:01 spezifischen, murinisierten TZR. (63) Jurkat76-Zellen sind immortalisierte Leukämiezellen (T-ALL), die keinen endogenen T-Zell-Rezeptor exprimieren und auch kein CD3 an der Oberfläche aufweisen. Nach Einbringen eines TZR kommt es in Jurkat76-Zellen zur Expression von CD3 an der Zelloberfläche.

Die Oberflächenexpression der TZR wurde nach der Elektroporation durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit einem CD3-Antikörper sowie mit einem gegen humane TZR gerichteten Antikörper (Anti-Human TZR $\alpha\beta$ -AK) gefärbt. Im Falle des murinisierten TZR_{11C12} erfolgte die Färbung mit dem Subfamilie-spezifischen Antikörper $V\beta$ 13-2.

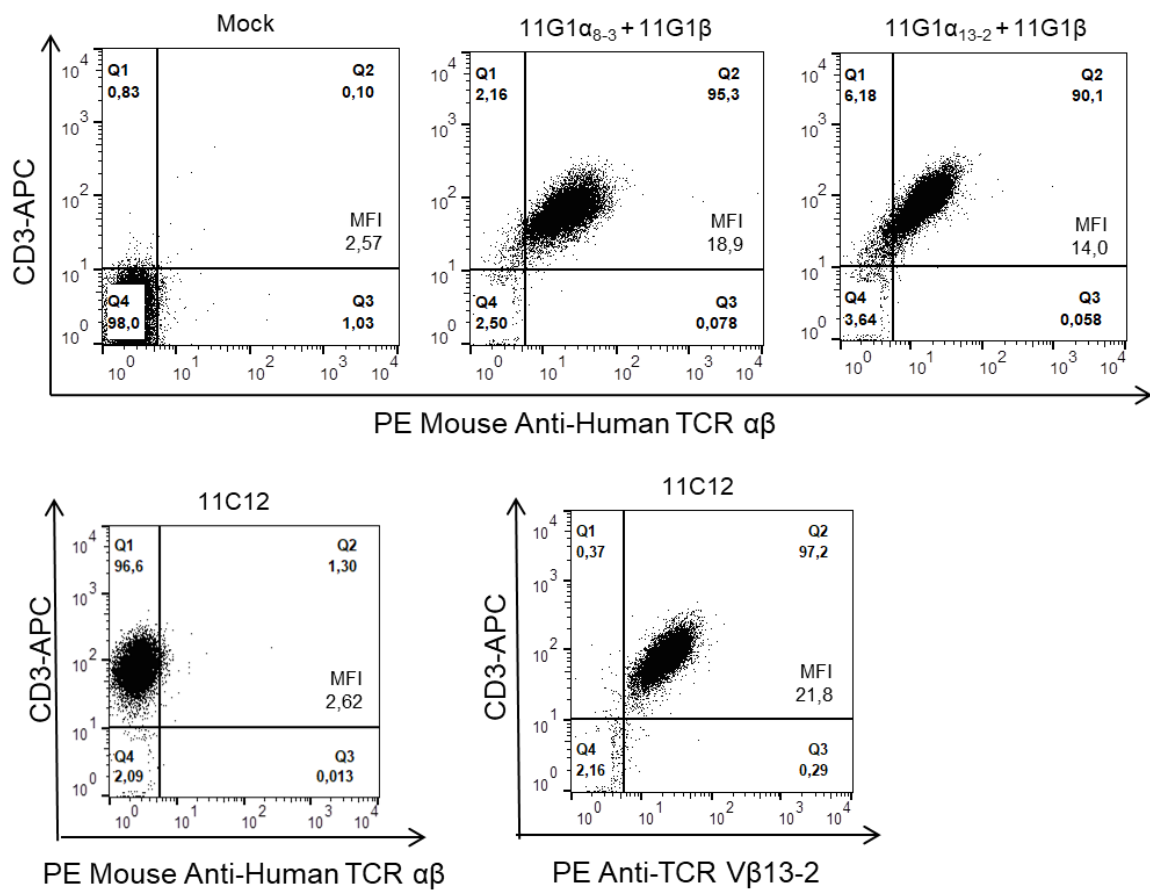


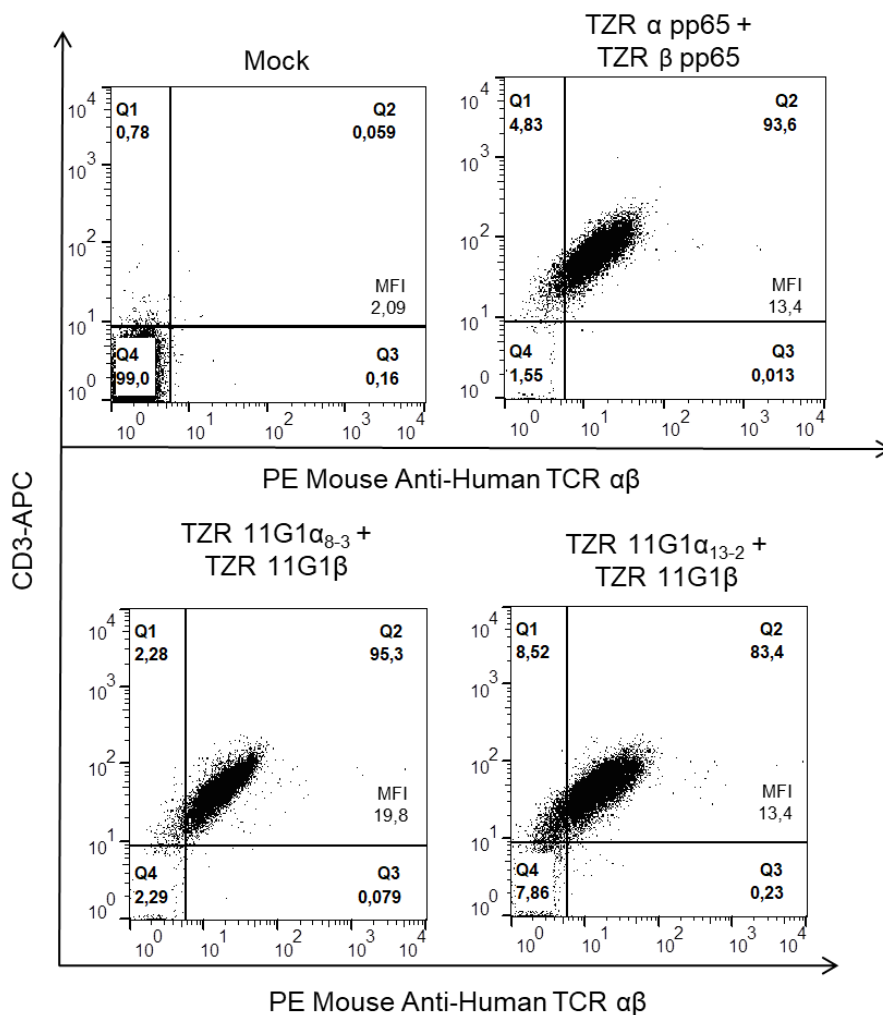
Abbildung 4: Expression des 11G1- bzw. 11C12-TZR auf Jurkat76-Zellen

Für die Elektroporation wurden 5×10^6 Jurkat76-Zellen pro Ansatz und $10 \mu\text{g}$ kodierender RNA pro TZR-Kette oder keine RNA (Mock) eingesetzt. 14 Stunden nach der Transfektion wurde die Oberflächenexpression der eingebrachten TZR mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Färbung erfolgte mit CD3-APC und PE Mouse Anti-Human TCR $\alpha\beta$ (11G1-TZR) und PE Anti-TCR V β 13-2 (11C12). Angegeben sind die Prozentzahlen der T-Zellen in den jeweiligen Quadranten des Punktediagramms, sowie die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der TZR-Expression.

Die beiden Rezeptorvarianten des 11G1-TZR ($\alpha_{8-3} + \beta$ bzw. $\alpha_{13-2} + \beta$) wurden an der Oberfläche mit ähnlicher Expressionsstärke wie der 11C12-TZR exprimiert (siehe Abbildung 4). Über die funktionelle TZR α/β -Kettenkombination kann somit mit der Kenntnis der Oberflächenexpression allein keine Aussage getroffen werden.

3.2 Kettenpaarungen zwischen 11G1-TZR und pp65-TZR

Da mit beiden α -Ketten eine TZR-Oberflächenexpression erreicht werden konnte, stellte sich die Frage, ob der 11G1-TZR auch mit einem anderen TZR dimerisieren kann. Für diese Fragestellung wurde als zweiter TZR der TZR_{pp65}, ein murinisierte Cytomegalievirus-spezifischer Rezeptor, verwendet. (64) Als Trägerzellen für die verschiedenen Kettenkombinationen (siehe dazu Abbildung 5) dienten erneut Jurkat76-Zellen. Durch das Fehlen eines endogenen TZR, ist es möglich ohne Konkurrenz die molekularen Interaktionen zwischen Ketten von verschiedenen T-Zell-Rezeptoren zu analysieren. (66)



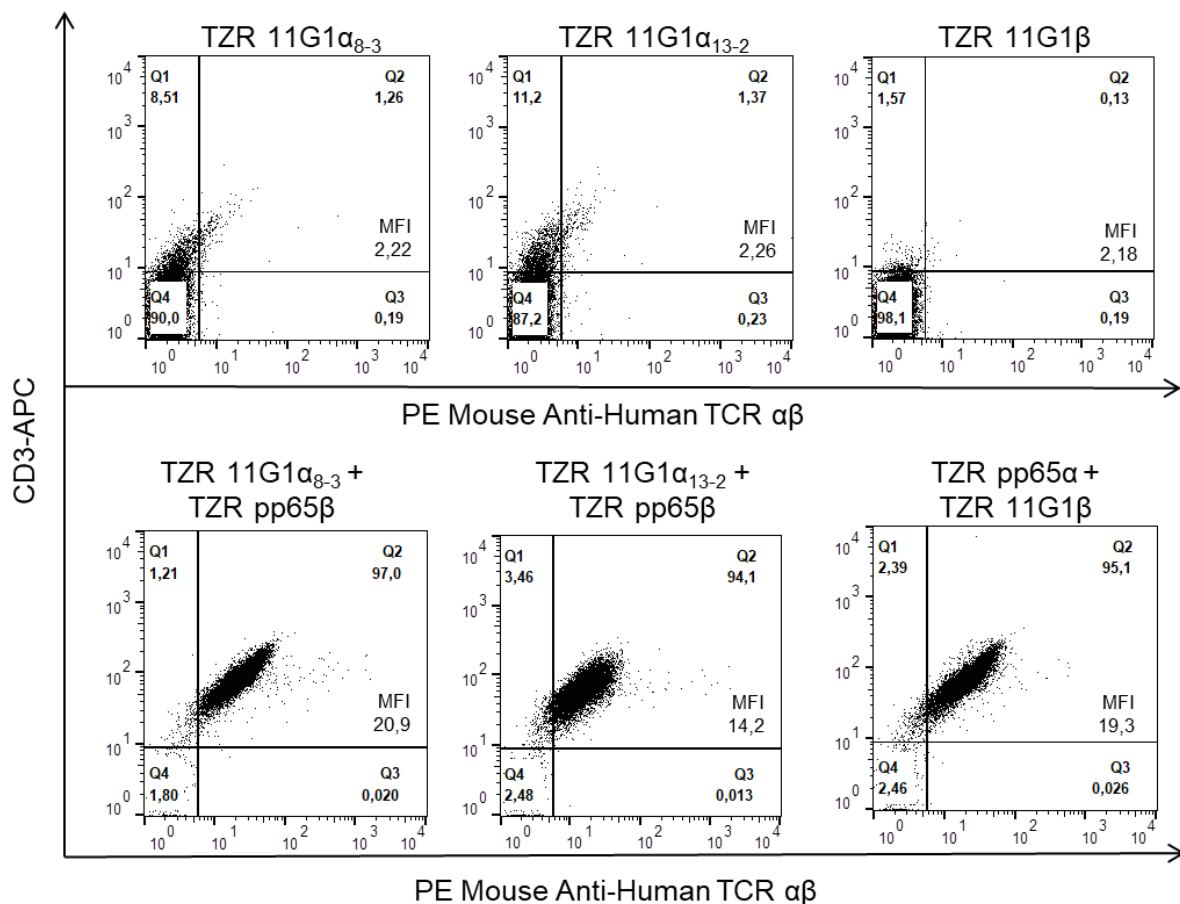


Abbildung 5: Expression der verschiedenen TZR-Kombinationen auf Jurkat76-Zellen

Jurkat76-Zellen wurden entsprechend des Elektroporationsprotokolls mit oben angegebenen Kettenkombinationen ausgestattet. 14 Stunden nach der Elektroporation erfolgte eine durchflusszytometrische Messung der TZR-Expression mit PE Mouse Anti-Human TCR $\alpha\beta$ und CD3-APC.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen konnte bei allen Kombinationen aus einer α - und einer β -Kette ein TZR-Komplex auf der Oberfläche angefärbt werden. Der 11G1-TZR zeigte in diesem Modell in Jurkat76-Zellen die Fähigkeit eine Paarung mit Ketten eines anderen TZR einzugehen. Die Expression der TZR mit verschiedenen Kettenkombinationen zeigte eine gewisse Variabilität. Für die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des Anti-human mAK TCR $\alpha\beta$ wurden Werte zwischen 13,4 und 20,9 gemessen. Die höchsten MFI-Werte zeigten die Kombinationen mit der α_{8-3} -Kette und den β -Ketten des pp65 α -TZR bzw. des 11G1-TZR. Insgesamt wiesen die Kombinationen mit der α_{13-2} -Kette im Vergleich zur α_{8-3} -Kette geringere MFI-Werte auf. Grundsätzlich lässt sich auch festhalten, dass Fehlpaarungen des 11G1-TZR mit anderen TZR entstehen können.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der beiden α -Kettenvarianten

3.3.1 Erkennung verschiedener EBV-LCL

Um die Funktionalität der beiden α -Ketten in Kombination mit der β -Kette zu untersuchen, wurden IFN- γ -ELISpots durchgeführt. Die im Test beobachtbare Zytokinausschüttung erlaubt Rückschlüsse auf die Fähigkeit der beiden Rezeptorvarianten spezifisch das HLA-DPB1*03:01-Antigen zu erkennen. Als Zielzellen wurden lymphoblastoide Zelllinien (LCL) verwendet. Dabei handelt es sich um B-Zellen verschiedener Spender, die mit Epstein-Barr-Virus immortalisiert wurden. Die verschiedenen TZR-Kettenkombinationen wurden in CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender eingebracht und anschließend erfolgte eine Kokultivierung mit den in Abbildung 6 angegebenen HLA-DPB1*03:01^{+/-}-LCL.

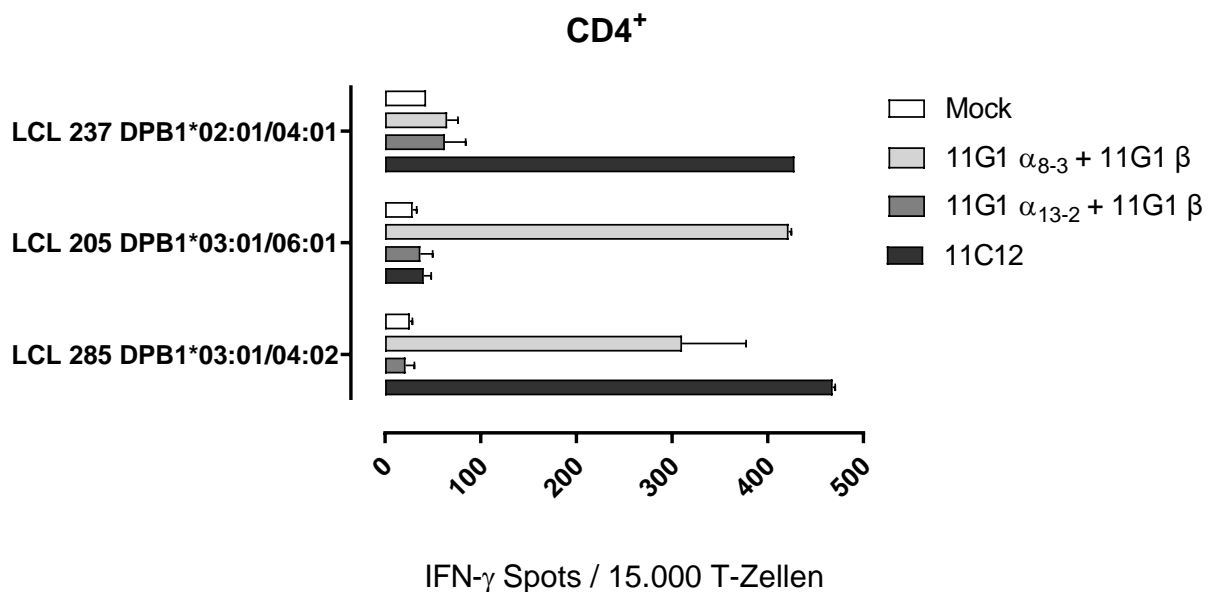


Abbildung 6: Erkennung von LCL-Zellen durch den 11G1-TZR in CD4⁺ T-Zellen, Vergleich der α_{8-3} und α_{13-2} -Kette

CD4⁺ T-Zellen zweier HLA-DP*04:01/03:01⁻ gesunder Spender (Don 140, Don 232) wurden zunächst immuno-magnetisch separiert, prä-stimuliert und für ca. 10 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit kodierender RNA des 11G1-TZR, 11C12 bzw. ohne RNA (Mock). Es wurden jeweils 10 μ g IVT-RNA pro TZR-Kette eingesetzt. 16-20 Stunden nach Elektroporation erfolgte der IFN- γ -ELISpot mit 3 verschiedenen LCL als Zielzellen. Die entsprechenden HLA-DP-Typisierungen sind in der Legende angegeben. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung. Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 0,3:1.

Eine spezifische Erkennung der HLA-DP*03:01⁺ LCL zeigte in den durchgeführten Versuchen die TZR-Kombination mit der α_{8-3} -Kette, nicht aber mit der α_{13-2} -Kette. Die zur Kontrolle eingesetzten HLA-DP*03:01⁻ LCL wurden von T-Zellen, die die Kombination aus α_{8-3} - und β -Kette exprimieren, nicht erkannt.

Die Kontrolle mit 11C12-TZR transfizierten T-Zellen zeigte eine erwartete IFN- γ -Ausschüttung bei Koinkubation mit 04:01⁺ bzw. 04:02⁺ LCL.

Feststellbar war außerdem eine leichte Hintergrundaktivierung der T-Zellen, da auch die ohne RNA elektroporierten Mock-Ansätzen eine geringe Menge IFN- γ produzierten. Dies ist am ehesten durch eine EBV-Reaktivität gegenüber den LCL erklärbar.

Insgesamt lässt sich aufgrund der deutlich spezifischeren IFN- γ -Ausschüttung vermuten, dass es sich bei der TZR-Kombination aus α_{8-3} -Kette und der β -Kette um die funktionelle Variante des 11G1-TZR handelt.

Die Kombination aus α_{13-2} / β -Kette induziert dagegen eine mit den Kontrollen vergleichbare, niedrige IFN- γ -Sekretion.

3.3.2 Erkennung primärer AML Blasten

Entscheidend für die therapeutische Anwendung des Rezeptors ist die Frage, ob primäre Leukämieblasten durch den 11G1-TZR erkannt werden. Die Reaktivität der mittels Elektroporation transfizierten T-Zellen gegenüber Leukämieblasten wurde ebenfalls mit IFN- γ ELISpots analysiert. Hierfür wurden primäre AML-Blasten zweier HLA-DPB1*03:01⁺ und eines HLA-DPB1*03:01⁻ Patienten verwendet (siehe Abbildung 7). Wiederum wurde der HLA-DPB1*04:01-spezifische 11C12-TZR als Kontrolle eingesetzt.

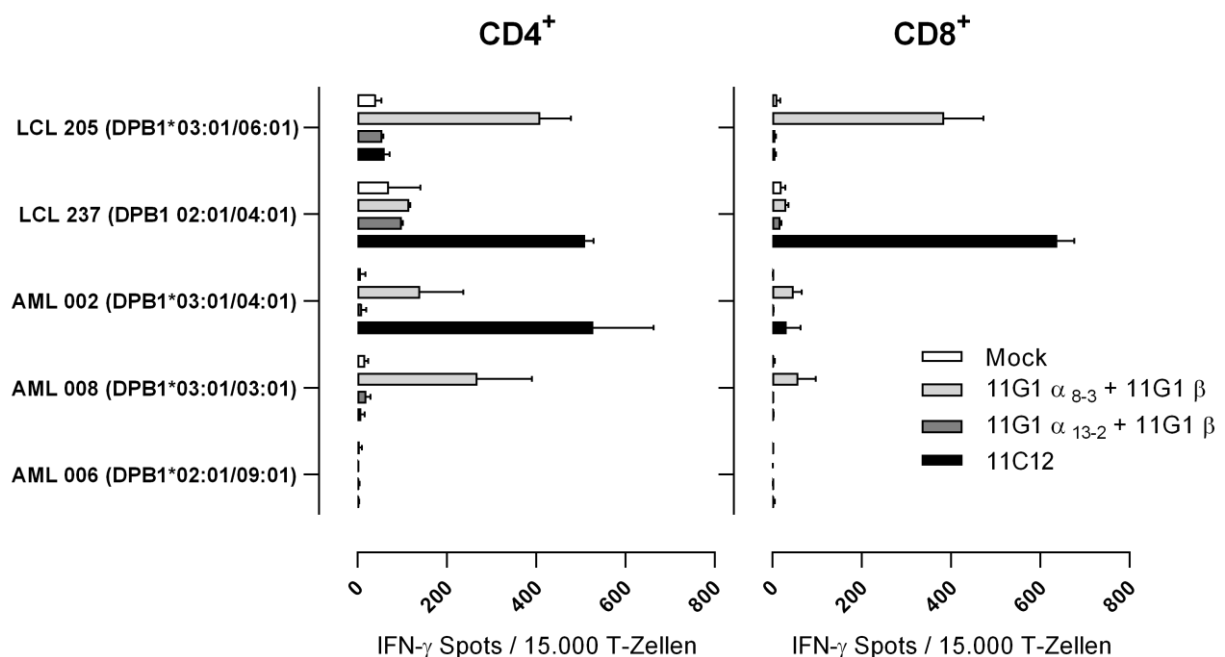


Abbildung 7: Erkennung von AML-Blasten

IFN- γ -Sekretion von mit TZR 11C12, 11G1 bzw. ohne RNA (Mock) elektroporierten CD4⁺ (links) und CD8⁺ (rechts) T-Zellen gegenüber verschiedenen AML-Blasten. EBV-LCL von HLA-DPB1*03:01 positiven und negativen Spendern wurden als Kontrollansätze eingesetzt. Der ELI-Spot erfolgte 16-20 Stunden nach der Elektroporation. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung von zwei HLA-DP*04:01/03:01⁻ gesunden Spendern (Don 197, 234). Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 0,3:1.

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die mit der α -8-3-Kette und der β -Kette des 11G1-TZR elektroporiert wurden, setzen bei Kontakt mit allo-HLA-DPB1*03:01⁺ AML-Blasten IFN- γ frei, wenn auch in geringerem Ausmaß als mit dem 11C12-TZR elektroporierte CD4⁺ T-Zellen (siehe AML 002). Die Ansätze mit der α -13-2-/ β -Kettenkombination zeigten

keine Reaktivität gegen HLA-DPB1*03:01⁺-Blasten. Die als Positivkontrollen eingesetzten 03:01⁺ EBV-LCL wurden von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die mit der α -8-3-Kette und der β -Kette des 11G1-TZR elektroporiert wurden, erkannt. Es bestand dagegen keine Reaktivität gegen 03:01⁻ LCL oder 03:01⁻ AML-Blasten (Negativkontrollen).

Außerdem war festzustellen, dass die IFN- γ -Freisetzung bei CD8⁺ T-Zellen erwartungsgemäß schwächer ausfiel als bei CD4⁺ T-Zellen. Dies ließ sich sowohl für den 11G1-TZR als auch für den 11C12-TZR beobachten.

Die Vermutung, dass es sich bei der α -8-3-Kette um die funktionelle α -Kette handelt, konnte mit diesem Experiment bestätigt werden. Im Folgenden wird deshalb der 11G1-TZR mit der α -8-3- und der β -Kettenpaarung als Wildtyp bezeichnet.

3.4 Generierung eines chimären 11G1-TZR

Wie im vorherigen Versuch geschildert, war die im ELISpot ermittelte IFN- γ -Sekretion transfizierter T-Zellen gegen primäre AML-Blasten beim 11G1-TZR geringer als beim murinisierten 11C12-TZR (siehe Abbildung 7).

In der Arbeitsgruppe wurde deshalb, eine modifizierte Rezeptorvariante entwickelt. (63) Durch eine höhere Oberflächenexpression bzw. präferentielle Kettenpaarung sollte auch eine verbesserte Erkennung erzielt werden. Dazu wurde ein Komplettaustausch der konstanten, humanen gegen die konstanten, murinen Domänen vorgenommen (Abbildung 8). Der so entstandene chimäre TZR wird im Folgenden als TZR_{chim} bezeichnet. Zudem wurde eine Kodonoptimierung durchgeführt. Dabei werden Kodons, die im menschlichen Genom selten vorkommen gegen häufiger vorkommendene Kodons ausgetauscht, ohne eine Änderung der Aminosäuresequenz zu verursachen. (67, 68)

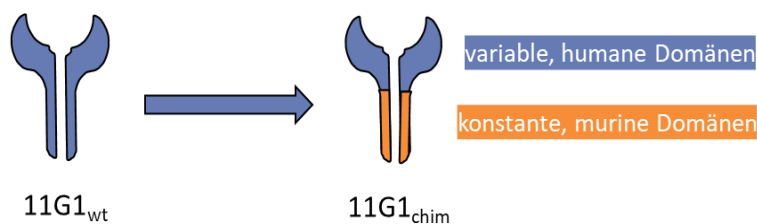


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kettenaustausches beim 11G1_{chim}

Kapitel 3.5 und 3.6 befassen sich mit der funktionellen Testung der neuen chimären Rezeptorvariante (11G1_{chim}) im Vergleich zum Wildtyp (11G1_{wt}).

3.5 Erkennung und Lyse primärer AML Blasten durch 11G1_{chim} und 11G1_{wt}-TZR

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich durch die Chimärisierung des TZR, Veränderungen in der Erkennung von HLA-DPB1*03:01⁺ LCL und primären AML-Blasten durch TZR-transfizierte T-Zellen im IFN- γ -ELISpot ergeben. Zusätzlich wurde auch das Lyseverhalten der T-Zellen, die mit dem 11C12, 11G1_{wt}- oder 11G1_{chim}-TZR transfiziert wurden, in ⁵¹Chrom-Freisetzungsanalysen miteinander verglichen.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Expression von 11G1_{chim} nach Elektroporation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eines HLA-DPB1*03:01⁻ gesunden Spenders mit kodierender RNA des 11G1_{chim} bzw. ohne RNA (Mock). Der 11G1_{chim}-TZR konnte aufgrund seiner murinen Domäne mit dem PE Anti-Mouse TCR β AK gefärbt werden. Für den 11G1_{wt}-TZR sind keine Expressionsdaten in T-Zellen gezeigt, da für diesen kein Subfamilien-spezifischer Antikörper verfügbar ist.

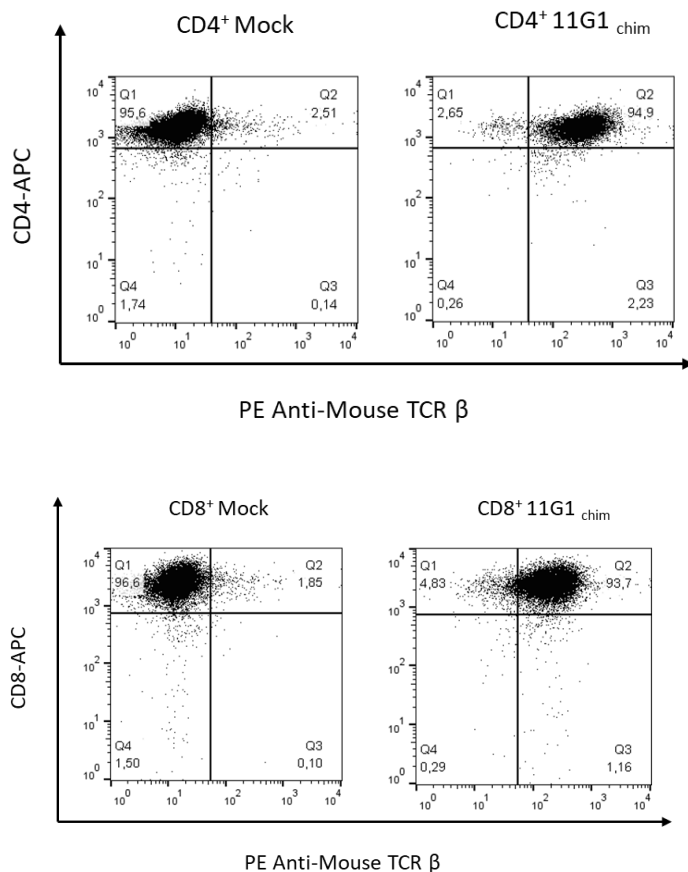


Abbildung 9: Expression des 11G1_{chim}-TZR auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Immunomagnetisch selektierte und stimulierte humane CD4⁺ (oben) und CD8⁺ T-Zellen (unten) zweier HLA-DPB1*03:01⁻ gesunder Spender wurden mit kodierender RNA des 11G1_{chim} bzw. ohne RNA (Mock) elektroporiert. Nach 16 Stunden wurde die Oberflächenexpression von CD4⁺, CD8⁺ und TZR 11G1_{chim} durchflusszytometrisch bestimmt. Die Färbung erfolgte mit CD4⁺/8⁺-APC und mit PE Anti-Mouse TCR β . Es sind repräsentative Daten des Donors 149 gezeigt.

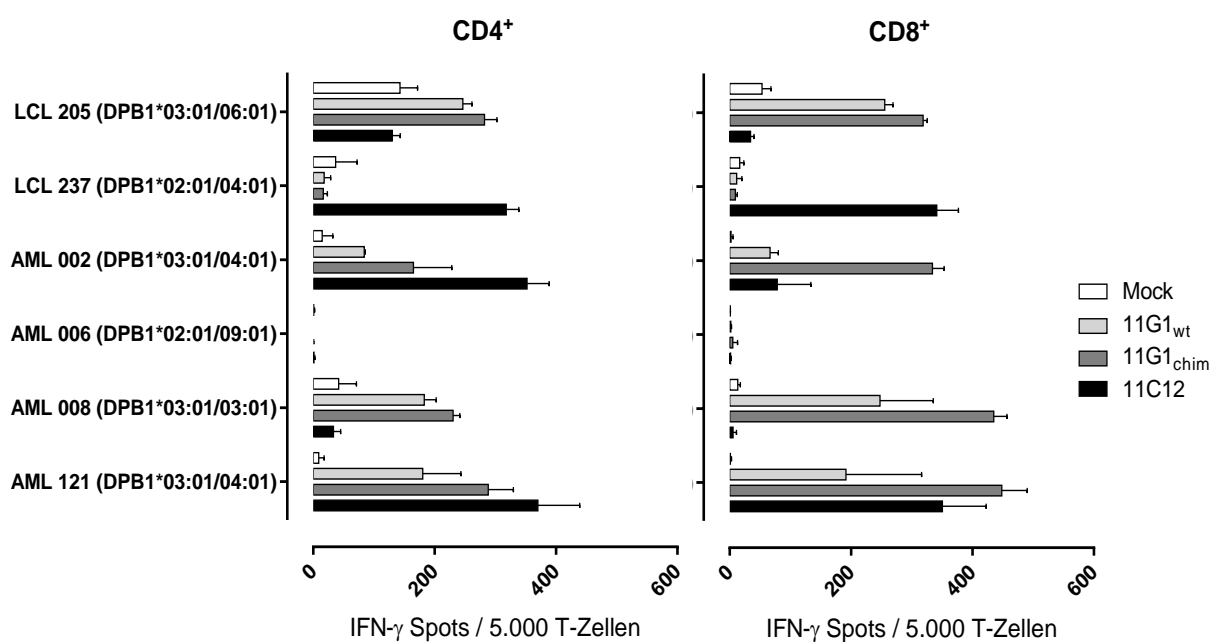


Abbildung 10: IFN- γ -Ausschüttung von CD4⁺ und CD8⁺ bei Kontakt mit primären AML-Blasten und EBV-LCL

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zweier HLA-DP*04:01/03:01⁻ Spender (Don. 149, 199) wurden mit kodierender RNA des TZR 11G1_{chim}, 11G1_{wt} bzw. 11C12 oder ohne RNA (Mock) elektroporiert. Es erfolgte ein IFN- γ -ELISpot nach Standardprotokoll mit den in der Grafik angegebenen EBV-LCL und AML-Blasten. Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 0,3:1. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung der beiden Spender.

Es zeigte sich, dass durch die Teilmurinisierung des 11G1-TZR eine deutliche Steigerung der IFN- γ -Ausschüttung im ELISpot erzielt werden konnte. Die als Kontrollen verwendeten EBV-LCLs wurden jeweils spezifisch vom 11G1- bzw. 11C12-TZR erkannt. Bei der HLA-DPB1 03:01⁺ LCL205 lag eine relativ starke IFN- γ -Sekretion durch Mock bzw. TZR 11C12 transfizierte CD4⁺ T-Zellen vor, was wahrscheinlich auf eine EBV-Reaktivität zurückzuführen ist. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, die mit dem chimären 11G1-TZR transfiziert wurden, zeigten eine erhöhte Spotzahl im Vergleich zu T-Zellen, die mit dem Wildtyp des 11G1-TZR ausgestattet wurden.

Die HLA-DPB1*03:01⁻ AML-Blasten (AML 006) erzeugten weder beim chimären noch beim Wildtyp-Rezeptor eine IFN- γ -Ausschüttung. Als Vergleich kamen erneut T-Zellen, die mit dem 11C12-TZR transfiziert wurden, zum Einsatz. Die ohne RNA elektroporierten T-Zellen (Mock) zeigten keine relevante IFN- γ -Ausschüttung.

Für die therapeutische Anwendung des Rezeptors sind neben der Erkennung auch die durch ihn vermittelte Zytotoxizität von Bedeutung. Zur *in vitro* Testung der lytischen Aktivität von T-Zellen kamen ⁵¹Chrom-Freisetzungstests zum Einsatz.

Als Zielzellen wurden EBV-LCLs und primäre AML-Blasten verwendet. Die in der Abbildung 11 gezeigten Ergebnisse konnten in einer zweiten Messung mit T-Zellen eines weiteren HLA-DPB1*03:01⁻ Spenders bestätigt werden. (Daten nicht gezeigt)

Es zeigte sich, dass die T-Zellen, die mit einem TZR ausgestattet wurden, die Fähigkeit zur HLA-DP-spezifischen Lyse von EBV-LCL und AML besitzen. Durch Mock transfizierte Zellen wurde dagegen keine Zytotoxizität vermittelt. Es bestand teilweise eine leichte Überlegenheit des 11G1_{chim}-TZR im Vergleich zur Wildtyp-Variante des Rezeptors. Dieser Unterschied war allerdings weniger deutlich ausgeprägt als in den ELISpot-Analysen. Die als Positivkontrolle eingesetzten T-Zellen mit dem 11C12 lysierten erwartungsgemäß HLA-DP 04:01⁺ Zielzellen.

Das Lyseverhalten der CD8⁺ T-Zellen war insgesamt auf einem höheren Niveau als das der CD4⁺ T-Zellen.

Zusammenfassend zeigten die T-Zellen, die mit dem 11G1-TZR ausgestattet wurden, eine spezifische Erkennung von HLA-DP*03:01⁺ Zielzellen (AML und LCL) und waren in der Lage diese spezifisch zu lysieren. Es fand dagegen keine Erkennung von 03:01⁻ Zielzellen durch mit dem 11G1-TZR ausgestattete T-Zellen statt.

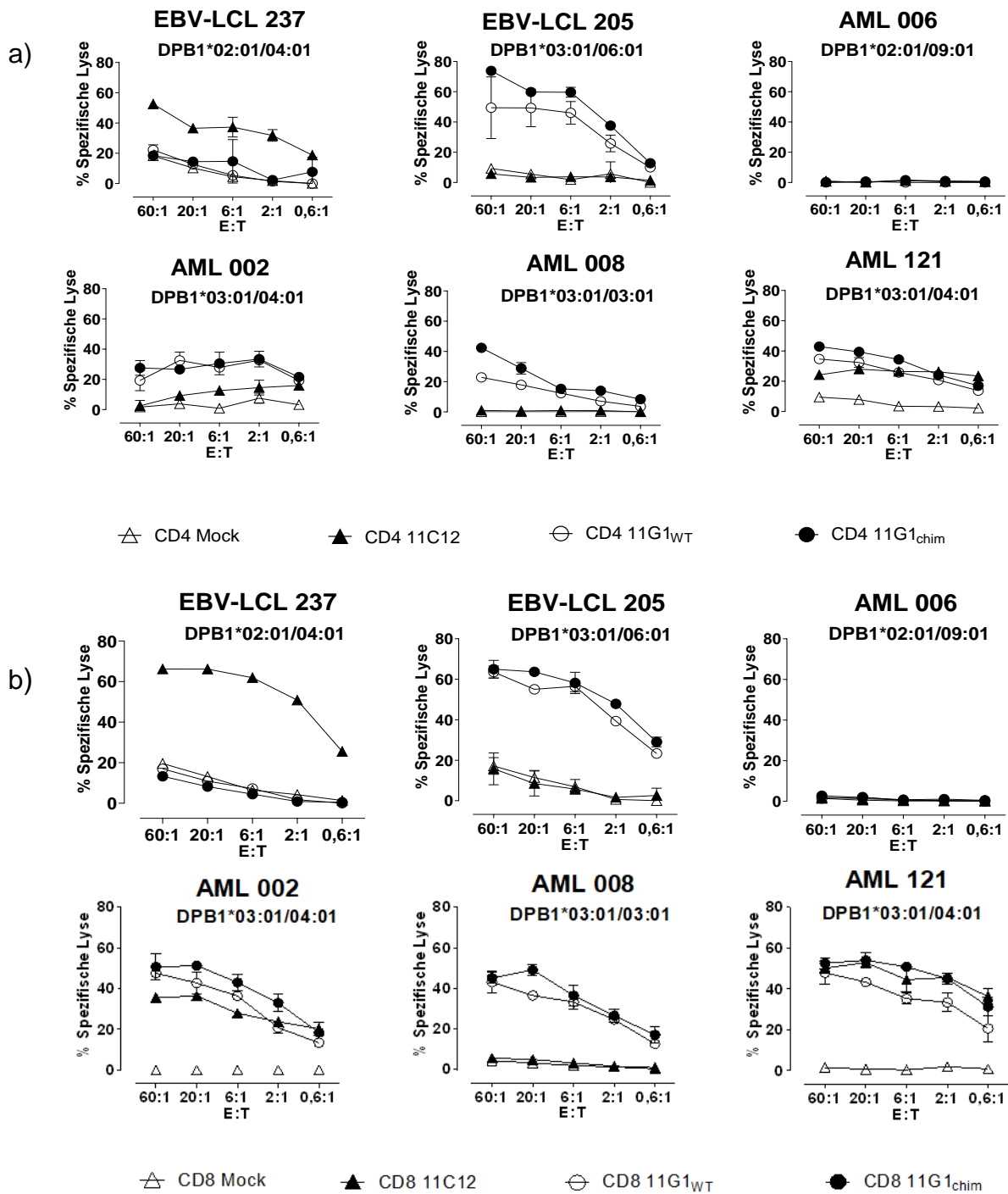


Abbildung 11: ⁵¹Chrom-Freisetungsanalysen

Dargestellt ist das Lyseverhalten von Mock transfizierten bzw. TZR 11C12, 11G1_{wt} oder 11G1_{chim} transfizierten (a) CD4⁺ und (b) CD8⁺-T-Zellen gegenüber EBV-LCLs und verschiedenen primären AML-Blasten. Für die Elektroporation wurden 5×10^6 Zellen pro Ansatz und $10 \mu\text{g}$ RNA pro TZR-Kette eingesetzt. Die Zellen wurden in den angegebenen Effektor-zu-Target-Verhältnissen (E:T) mit 1500 Target-Zellen/well ausgesät. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden. Gezeigt ist jeweils die spezifische Lyse, die sich aus der gemessenen ⁵¹Chrom-Freisetzung ergibt. Bei den Messwerten handelt es sich um repräsentative Doppelwerte mit Standardabweichung eines HLA-DP*04:01- und 03:01- gesunden Spenders (Don.199).

3.6 Reaktivität des 11G1_{chim} und 11G1_{wt}-TZR gegenüber nicht-hämatopoetischen Zellen

3.6.1 Fibroblasten

Durch die Modifizierung des 11G1-TZR konnte eine Steigerung der Erkennung von EBV-LCL und primären AML-Blasten erreicht werden. Dadurch stellte sich die Frage, ob sich durch die Chimärisierung auch Veränderungen in der Erkennung von potenziellen GvHD-Zielzellen ergeben. Als *in vitro* Modell für die Reaktivität gegenüber nicht-hämatopoetischen Geweben wurden primäre Fibroblasten verwendet. Der bereits in den Vorversuchen als Referenz eingesetzte 11C12-TZR weist eine Reaktivität gegen Fibroblasten auf und wurde auch hier erneut als Kontrolle eingesetzt. (63)

Um eine HLA-DP-Expression an der Oberfläche der Fibroblasten zu induzieren, erfolgte eine Vorbehandlung der Fibroblasten mit 500U/ml IFN- γ für 96 Stunden vor dem eigentlichen Versuch. Mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie konnte die Induktion einer HLA-DP-Expression nachgewiesen werden. (Abbildung 12)

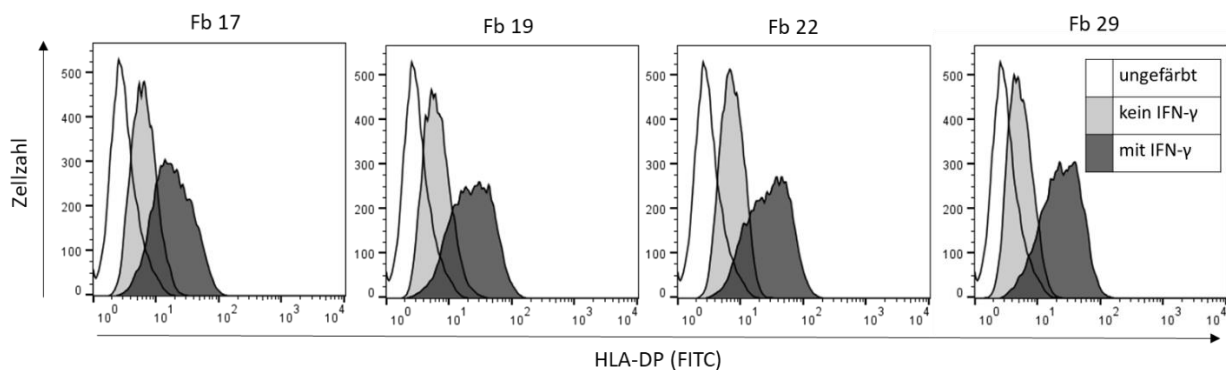


Abbildung 12: Expression von HLA-DP auf Fibroblasten nach Behandlung mit IFN- γ

Primäre Fibroblasten der Spender 17,19,22, und 29 wurden mit 500 U/ml IFN- γ behandelt. Nach 96 Stunden wurde die HLA-DP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt, wobei hierfür eine Färbung mit B7-21-AK und sekundär mit gam-FITC erfolgte. Die Fibroblasten, die mit IFN- γ vorbehandelt wurden, sind in dunkelgrau dargestellt.

Zur Messung der Erkennung der Fibroblasten durch 11G1-TZR exprimierende T-Zellen wurden mehrere ELISpots durchgeführt. Als Positivkontrollen kamen die HLA-DPB1*03:01/06:01⁺ EBV-LCL 205 und die HLA-DPB1*02:01/04:01⁺ EBV-LCL237 zum Einsatz.

Es zeigte sich (siehe Abbildung 13), dass CD4⁺ T-Zellen, die mit dem chimären 11G1-TZR transfiziert wurden, bei Kontakt mit IFN- γ -vorbehandelten HLA-DPB1*03:01⁺ Fibroblasten spezifisch IFN- γ produzierten. Die T-Zellen, die mit dem Wildtyp des 11G1-TZR ausgestattet wurden, erzeugten dagegen nur sehr geringe Spot-Zahlen. Die als Kontrollen eingesetzten EBV-LCLs wurden HLA DP-spezifisch von allen drei verwendeten Rezeptoren (11G1_{wt}, 11G1_{chim}, 11C12) erkannt. Gegen Fibroblasten ohne IFN- γ -Vorbehandlung zeigte keiner dieser Rezeptoren eine Reaktivität. Es fand keine Erkennung von IFN- γ -vorbehandelten Fibroblasten durch die T-Zellen, die nicht mit einem TZR ausgestattet wurden (Mock), statt.

Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich bei den Zellen, die mit dem 11G1_{chim}-TZR elektroporiert wurden, nur bei Fibroblasten des Spenders 19 eine geringe Produktion von IFN- γ . Ansonsten zeigten nur die 11C12-TZR exprimierenden T-Zellen eine HLA DP-spezifische Reaktivität gegenüber IFN- γ -vorbehandelten Fibroblasten.

Durch die Chimärisierung des 11G1-TZR konnte eine Steigerung der Erkennung von HLA-DPB1*03:01⁺ LCL sowie von HLA-DPB1*03:01⁺ AML (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11) erreicht werden, ohne dabei eine Reaktivität gegenüber HLA-DPB1*03:01⁺ Fibroblasten unter nicht inflammatorischen Bedingungen zu erzeugen. Unter inflammatorischen Bedingungen fand dagegen eine spezifische Erkennung von HLA DPB1*03:01⁺ Fibroblasten durch CD4⁺ T-Zellen, die mit dem 11G1_{chim}-TZR ausgestattet wurden, statt. (siehe Abbildung 13)

Zelltyp	EBV-LCL 205	EBV-LCL 237	Fb 17	Fb 19	Fb 22	Fb 29
HLA-DP B1*	03:01/06:01	02:01/04:01	02:01/03:01	03:01/04:01	04:01/04:02	04:01/03:01

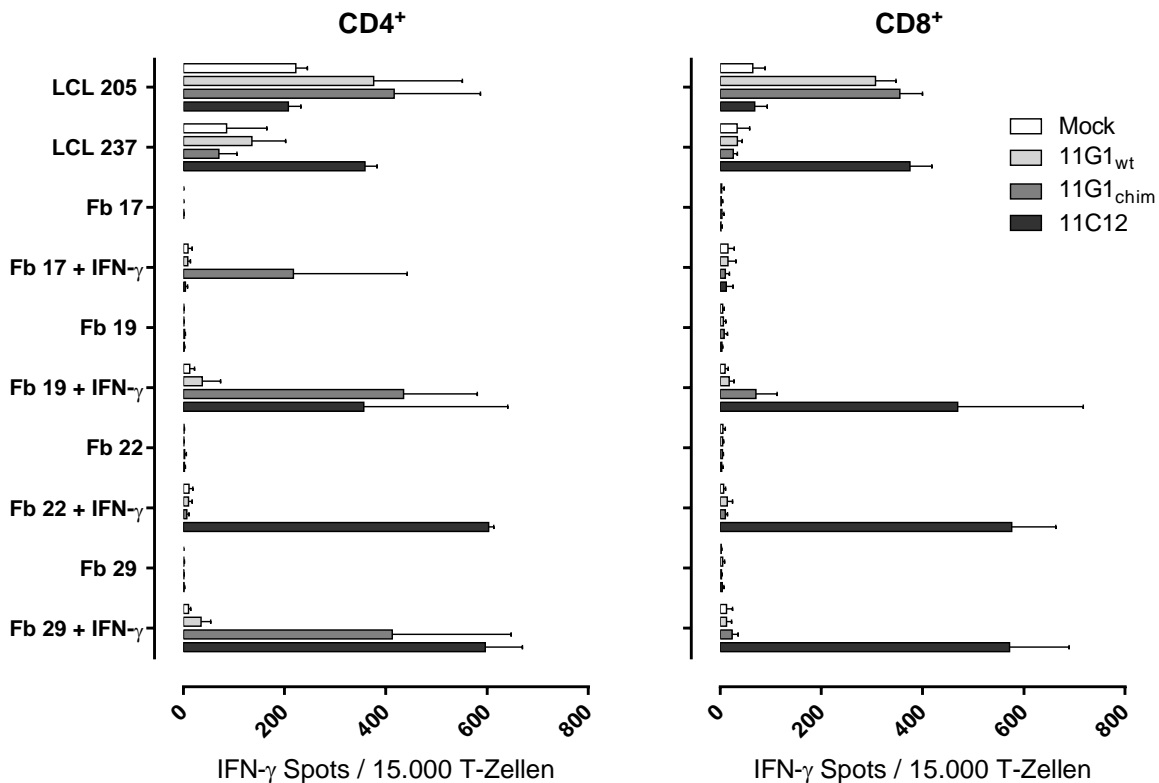


Abbildung 13: IFN- γ -Ausschüttung elektroporierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei Kontakt mit Fibroblasten mit bzw. ohne vorherige IFN- γ -Behandlung

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dreier HLA-DP*04:01/03:01⁻ Spender (Don. 129, 197, 234) wurden mit kodierender RNA des TZR 11G1_{chim}, 11G1_{wt} bzw. 11C12 oder ohne RNA (Mock) elektroporiert. Es erfolgte ein IFN- γ -ELISpot nach Standardprotokoll mit 15.000 T-Zellen/well. Als Zielzellen wurden die in der Grafik angegebenen EBV-LCL und primären Fibroblasten verschiedener Spender verwendet. Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 0,3:1. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung der drei verschiedenen T-Zell-Spender.

3.6.2 Humane und xenogene Zelllinien

Da der chimärisierte 11G1-TZR eine Reaktivität gegenüber Fibroblasten zeigte, wurden Experimente mit weiteren humanen und xenogenen Zelllinien durchgeführt. Bei den eingesetzten Zelllinien handelt es sich um humane Kolonkarzinomzellen (Sw480), humane Osteosarkomzellen (Saos-2), Zellen des humanen, malignen Melanoms (Sk29mel) sowie Nierenzellen der grünen Meerkatze (Cos-7). Die aufgeführten Zelllinien sind nicht-hämatopoetischem Ursprung. Das bedeutet, dass

unter nicht-inflammatorischen Bedingungen auf der Oberfläche dieser Zellen keine MHC-Klasse-II Moleküle wie HLA-DP exprimiert werden. Um eine Oberflächenexpression von HLA-DP in diesen Zellen zu erreichen, wurden diese mit Hilfe von Elektroporation mit HLA-DPA1*01:03/B1*03:01 transfiziert. Als Positiv- und Negativkontrollen kamen erneut HLA-DPB1*03:01⁺ bzw. HLA-DPB1*03:01⁻ EBV-LCL zum Einsatz.

Die Oberflächenexpression wurde vor den durchgeführten IFN- γ -ELISpot-Analysen durchflusszytometrisch ermittelt.

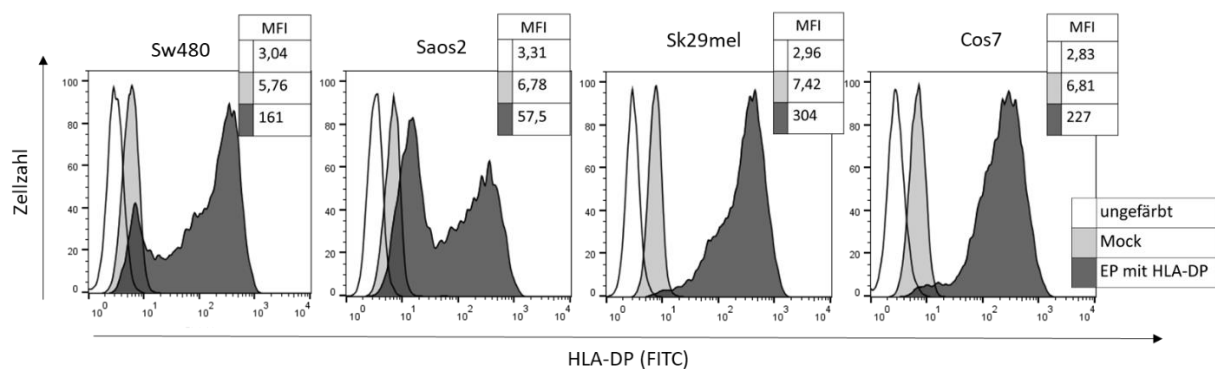


Abbildung 14: Expression von HLA-DP nach Elektroporation verschiedener humaner und xenogener Zelllinien

Verschiedene Zelllinien (Sw 40, Saos2, Sk29mel und Cos7) wurden mit kodierender mRNA elektroporiert (dunkelgrauer Graph), um eine Expression von HLA-DPA1*01:03/-DPB1*03:01 zu erzeugen. In hellgrau sind die ohne RNA elektroporierten Zellen (Mock) dargestellt. Die Färbung erfolgte mit B7-21-AK und gam-FITC. Der weiße Graph entspricht den ungefärbten Zellen.

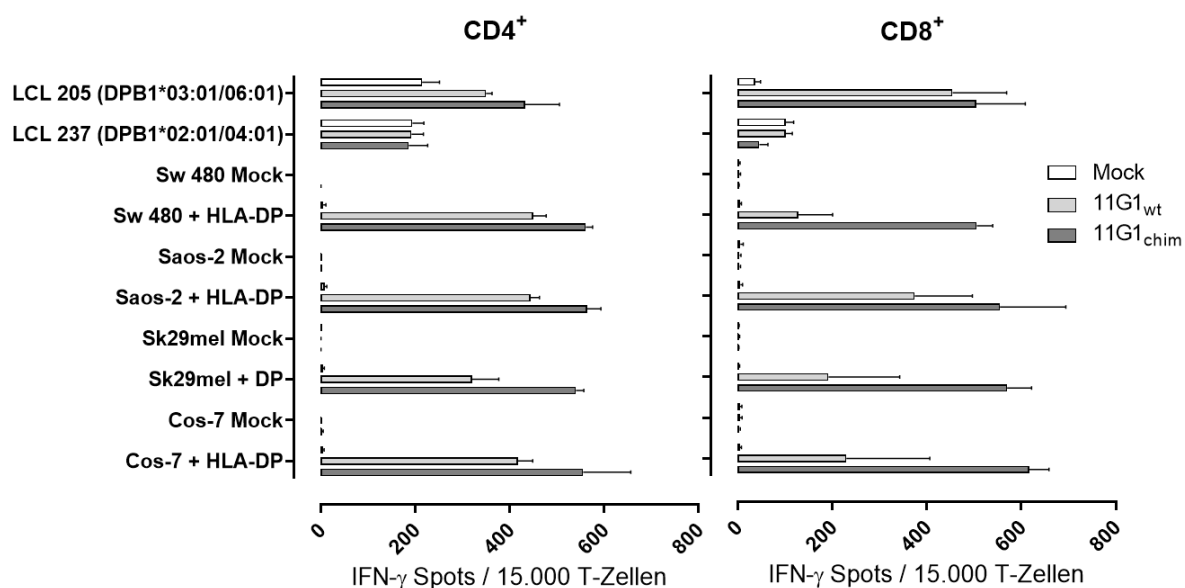


Abbildung 15: IFN- γ -Ausschüttung von transfizierten T-Zellen bei Kontakt mit humanen und xenogenen Zelllinien mit und ohne HLA-DP-Expression

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von zwei HLA-DP*04:01/03:01⁻ Spendern (Don. 232, 234) wurden mit kodierender RNA des TZR 11G1_{chim} und 11G1_{wt} oder ohne RNA (Mock) elektroporiert. Es erfolgte ein IFN- γ -ELISpot nach Standardprotokoll mit 15.000 T-Zellen/well. Als Zielzellen wurden verschiedene humane und xenogene Zelllinien verwendet, die mittels Elektroporation mit HLA-DPA1*01:03/B1*03:01 ausgestattet wurden bzw. ohne RNA elektroporiert wurden (Mock). Als Kontrollen wurden die in der Grafik angegebenen EBV-LCL verwendet. Das Effektor-Zielzell-Verhältnis betrug 0,3:1. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung der beiden T-Zell-Spender.

In der Versuchsauswertung (siehe Abbildung 15) zeigte sich bei allen HLA-DPB1*03:01⁺ Zelllinien eine Ausschüttung von IFN- γ durch 11G1_{wt} und 11G1_{chim}-TZR transfizierte T-Zellen. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, die entweder mit dem 11G1_{wt}- als oder mit dem 11G1_{chim}-TZR ausgestattet wurden, zeigten eine spezifische Erkennung der Zielzellen. Die Mock-Ansätze der Zelllinien, die ohne HLA-DP-RNA elektroporiert wurden, induzierten keine Zytokinproduktion in den TZR exprimierenden T-Zellen. Mock-transfizierte T-Zellen erkannten ihrerseits auch keine HLA-DP-tragenden Zellen.

Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten mit Fibroblasten, zeigten in diesem Versuch beide Varianten des 11G1-TZR eine Reaktivität gegenüber HLA-DPB1*03:01⁺ nicht-hämatopoetischen Zelllinien.

3.7 Unterschiede zwischen IFN- γ -Behandlung und Elektroporation

3.7.1 Fibroblasten

Um zu analysieren, ob die oben beschriebenen Erkennungsunterschiede auf die Methode der HLA-DP-Expressionsinduktion zurückzuführen sind, wurden Fibroblasten sowohl mit IFN- γ vorbehandelt als auch mittels Elektroporation mit HLA-DP ausgestattet.

Bereits in der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden angewandten Verfahren. Die MFI der HLA-DP-Expression stieg durch Zytokinbehandlung mit IFN- γ auf ein circa dreifaches des Ausgangswert der unbehandelten Fibroblasten. Mit der Elektroporation konnte der Ausgangswert etwa um das 24-fache erhöht werden. (Abbildung 16)

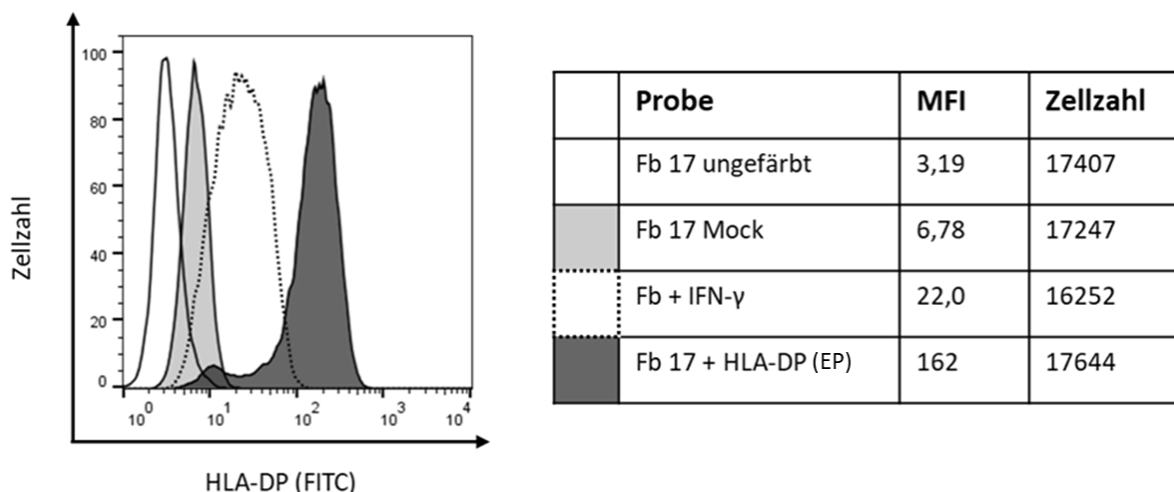


Abbildung 16: Oberflächenexpression von HLA-DP auf Fibroblasten nach IFN- γ -Behandlung

Fibroblasten wurden entweder für 96 Stunden mit IFN- γ behandelt oder mit HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*03:01-RNA elektroporiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte unmittelbar vor dem durchgeführten ELISpot. Die Proben wurden mit primär mit 3 μ l B7-21-AK und sekundär mit 3 μ l gam-FITC gefärbt. Die weiße Kurve entspricht den ungefärbten und die graue den Mock Fibroblasten (ohne RNA). Mit der gestrichelten Kurve sind die mit IFN- γ behandelten Fibroblasten und mit der dunkelgrauen die mit HLA-DP elektroporierten Zellen dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Daten einer von zwei Versuchsdurchführungen.

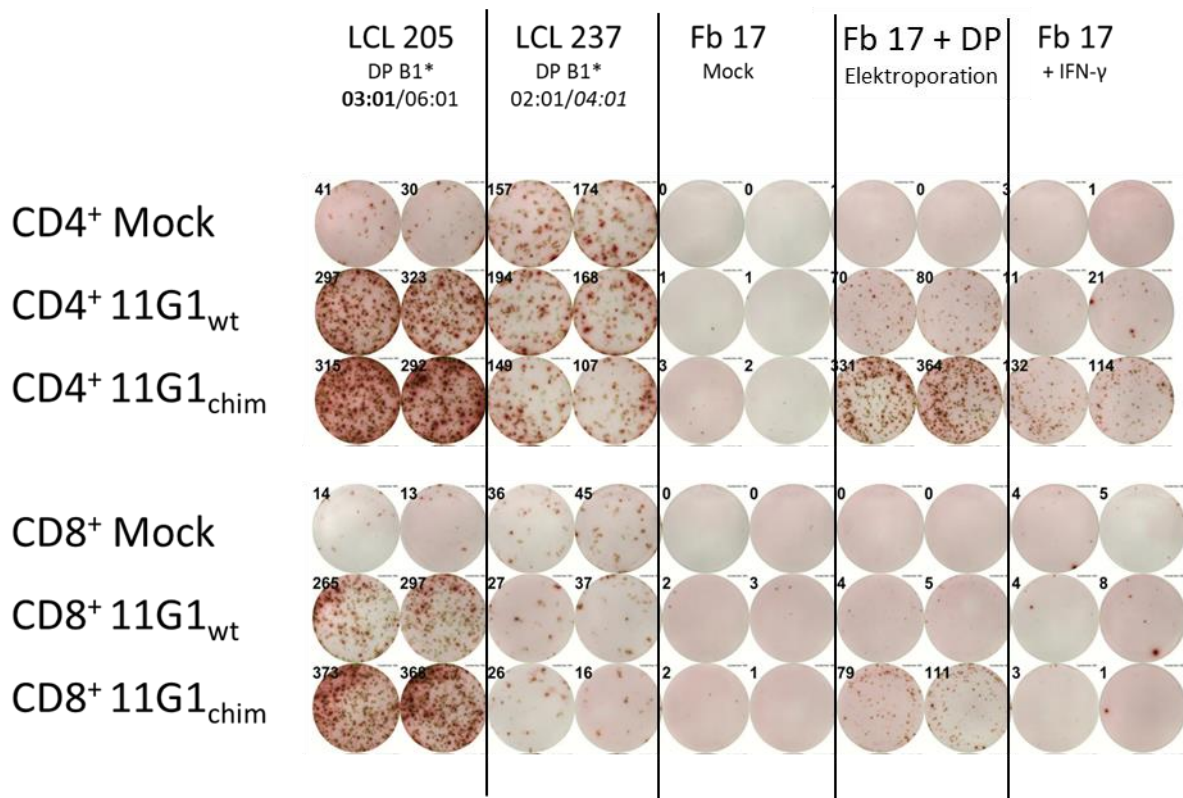


Abbildung 17: IFN- γ -Ausschüttung von TZR-transfizierten T-Zellen gegenüber IFN- γ vorbehandelten bzw. HLA-DP transfizierten Fibroblasten

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zweier HLA-DP*04:01/03:01- Spender (Don. 124 u. 199) wurden mit kodierender RNA des TZR 11G1_{chim}, 11G1_{wt} oder ohne RNA (Mock) elektroporiert. Es erfolgte ein IFN- γ -ELISpot nach Standardprotokoll mit 5.000 T-Zellen/well. Als Zielzellen wurden die in der Grafik angegebenen EBV-LCL und primären Fibroblasten (Spender 17) verwendet. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen T-Zell-Spenders (Don. 199) aus n = 2.

Auch im ELISpot zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse je nach Vorbehandlung der Fibroblasten. (Abbildung 17) Analog zur höheren Oberflächenexpression fanden sich mehr Spots in den Wells mit den mit HLA-DP elektroporierten Fibroblasten. Während die CD4⁺ T-Zellen mit dem 11G1_{wt}-TZR bei Kontakt mit IFN- γ -behandelten Fibroblasten kaum messbare Spots erzeugten, reagierten sie auf die elektroporierten Fibroblasten mit einer deutlicheren Zytokinausschüttung. Die mit dem TZR-11G1_{chim} ausgestatteten CD4⁺ T-Zellen erkannten sowohl die elektroporierten als auch die IFN- γ -behandelten Fibroblasten. Dabei war die Spotzahl höher bei den Fibroblasten, die auch eine höhere Oberflächenexpression von HLA-DP aufweisen. Die Zellen, die mit dem chimären TZR ausgestattet wurden, produzierten mehr Spots als solche, die mit dem 11G1_{wt} ausgestattet wurden. In CD8⁺-Zellen war nur in den Wells mit

elektroporierten Fibroblasten und 11G1_{chim} eine Zytokinausschüttung nachweisbar. Die 03:01⁺ LCL-Kontrollen wurden in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vom 11G1_{wt} und 11G1_{chim} erkannt. T-Zellen, die nicht mit kodierender RNA elektroporiert wurden (Mock), zeigten keine spezifische Erkennung der Fibroblasten, unabhängig davon, ob diese mit IFN- γ vorbehandelt oder mittels Elektroporation mit HLA-DP ausgestattet wurden.

Zusammenfassend bestehen Unterschiede bei der HLA-DP-Expression je nachdem ob diese durch Zugabe von IFN- γ oder durch Elektroporation induziert wird. Eine höhere HLA-DP Oberflächenexpression auf der Zielzelle geht auch mit einer gesteigerten Erkennung durch den 11G1_{wt} bzw. 11G1_{chim}-TZR einher.

3.7.2 Humane Zelllinien

Die Unterschiede zwischen der Elektroporation und IFN- γ -Behandlung sollte auch noch an weiteren Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die DP03:01⁺ Zelllinien Sk5mel und HCT116 verwendet. Es handelt sich bei den Sk5mel um eine humane Melanomzelllinie und bei den HCT116 um eine humane Kolonkarzinomzelllinie.

HLA-DPB1*03:01⁺ bzw. HLA-DPB1*03:01⁻ EBV-LCL wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen eingesetzt.

Die durchgeführten FACS-Analysen zeigten erneut eine effiziente HLA-DP-Expression nach Elektroporation. Im Vergleich dazu, zeigte sich durch die IFN- γ -Behandlung nur eine minimale Zunahme der MFI-Werte/der HLA DP-Expression an der Zelloberfläche. (Abbildung 18)

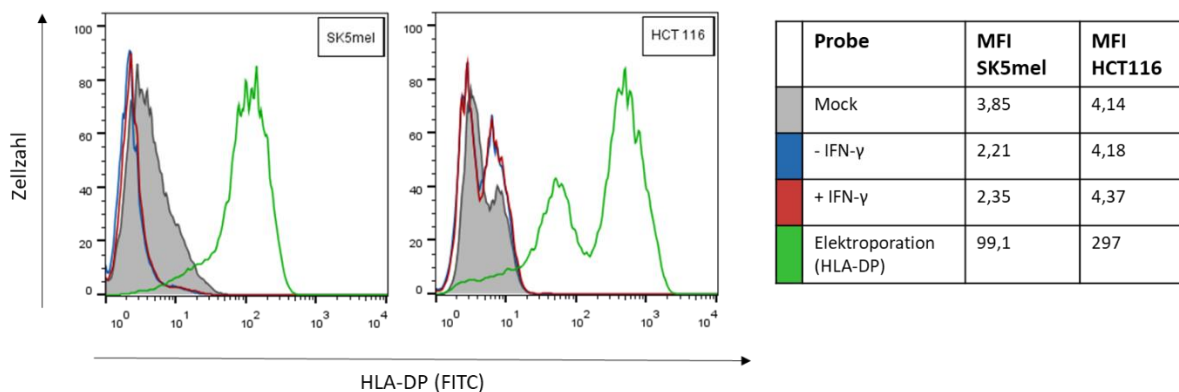


Abbildung 18: Oberflächenexpression von HLA-DP auf den Zelllinien SK5mel sowie HCT116 nach IFN- γ -Behandlung bzw. Elektroporation mit HLA-DP

Fibroblasten wurden entweder für 96 Stunden mit IFN- γ behandelt oder mit HLA-DPA1*01:03 + HLA-DPB1*03:01-RNA elektroporiert. Es erfolgte eine Färbung mit B7-21-AK und gam-FITC.

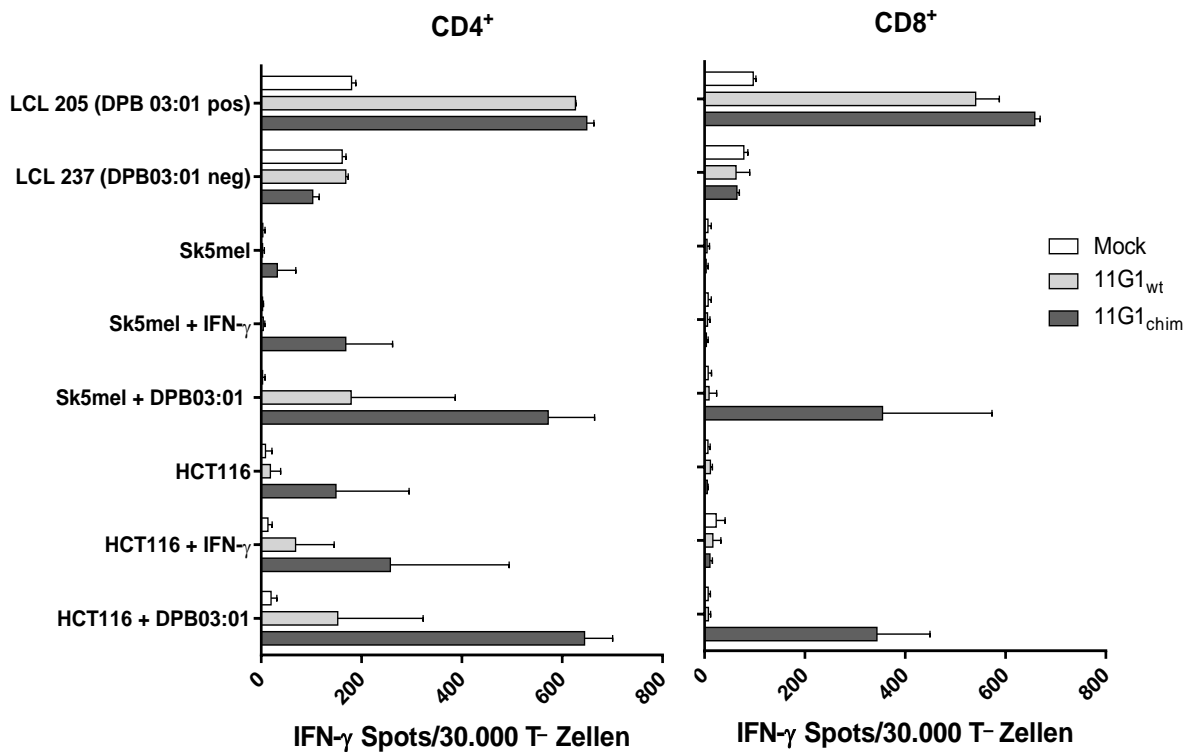


Abbildung 19: IFN- γ -Ausschüttung von transfizierten T-Zellen bei Kontakt mit den Zelllinien Sk5mel und HCT116 mit HLA-DP-Expression, welche durch IFN- γ oder Elektroporation induziert wurde

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zweier HLA-DP*04:01/03:01⁻ Spender (Don. 232 u. 233) wurden mit kodierender RNA des TZR 11G1_{chim}, 11G1_{wt} oder ohne RNA (Mock) elektroporiert. Es erfolgte ein IFN- γ -ELISpot nach Standardprotokoll mit 30.000 T-Zellen/well. Als Zielzellen wurden die in der Grafik angegebenen EBV-LCL sowie die Zelllinien Sk5mel und HCT116 verwendet. Die Zelllinien wurden entweder für 96h mit IFN- γ (mit 500U/ml) inkubiert, durch Elektroporation mit HLA-DP 03:01 ausgestattet oder unbehandelt eingesetzt. Gezeigt sind die Mediane gepoolter Doppelwerte mit Standardabweichung der beiden HLA-DP*04:01⁻, 03:01⁻ Spender.

Es zeigten sich im IFN- γ -ELISpot ebenfalls Unterschiede zwischen dem 11G1_{wt} und dem 11G1_{chim} sowie zwischen den beiden Möglichkeiten zur DP-Expressionsinduktion (Abbildung 19). Durch CD8⁺ T-Zellen wurden nur HLA-DP elektroporierte Zielzellen erkannt und diese auch nur vom TZR-11G1_{chim}. Mit dem 11G1_{wt} ausgestattete CD4⁺ T-Zellen zeigten ebenfalls eine Erkennung der Zielzellen, die mit HLA-DPB1 03:01 elektroporiert wurden, jedoch in geringerem Ausmaß als die Zellen, die mit dem 11G1_{chim} ausgestattet wurden. Die als Positivkontrollen eingesetzte HLA-DP 03:01⁺ LCL wurde von allen T-Zellen, die den 11G1_{wt} bzw. den 11G1_{chim} auf der Oberfläche exprimieren, erkannt.

Die mit IFN- γ behandelten HCT116 und Sk5mel wurden weder von 11G1_{wt} noch 11G1_{chim} exprimierenden CD8⁺ T-Zellen erkannt.

Analog zu den Versuchen mit Fibroblasten (siehe Abbildung 17), zeigten sich Unterschiede bei der Erkennung der HLA-DPB1 03:01⁺ Zelllinien durch den 11G1-TZR, abhängig davon ob die Zellen elektroporiert oder mit IFN- γ behandelt wurden.

Auch mit den beiden getesteten Zelllinien Sk5mel und HCT116 zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Experimenten mit Fibroblasten. Eine Erkennung nicht-hämatopoetischer Zelllinien durch den 11G1-TZR ist möglich, die einwirkenden Faktoren werden in den Kapiteln 4.4 und 4.5 genauer besprochen.

4 Diskussion

Konzepte zur Therapie von malignen Erkrankungen richteten sich in der Vergangenheit vor allem gegen besonders teilungsaktive Zellen. Die Suche nach zielgerichteten, effektiven Therapien mit einem reduzierten Nebenwirkungsprofil steht im Zentrum der Forschung. Ein Fortschritt in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie konnte vor allem bei Hochrisikoprofil und therapierefraktären Formen durch die Durchführung von allogenen Stammzelltransplantationen erreicht werden. (69) Die Immunzellen des Spenders sind maßgeblich verantwortlich für die Eradikation der Leukämiezellen (GvL-Effekt). Allerdings kann sich die Alloreaktivität der Immunzellen nicht nur gegen maligne Zellen richten, sondern auch gegen andere Körperzellen des Patienten. Die Folge davon ist das Auftreten einer GvHD. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich deshalb unter anderem damit eine Trennung von GvH- und GvL-Effekt zu erreichen. (35)

Wie bereits in der Einleitung beschrieben werden beide Effekte vor allem von T-Zellen vermittelt (siehe Kapitel 1.3). In Studien wurde versucht einen GvL-Effekt zu induzieren, indem AML-Patienten mit Rückfall nach allogener Stammzelltransplantation periphere Spenderlymphozyten infundiert wurden (donor lymphocyte infusion). Diese Behandlung birgt allerdings auch ein hohes Risiko für eine GvHD und brachte im Kontext der AML nicht die erhofften Erfolge. (38, 70). Anstatt einer Mischung von verschiedenen T-Zellen mit unbekannter Reaktivität zu transferieren, können auch T-Zellen, die mit einem spezifischen TZR ausgestattet wurden, eingesetzt werden, was zurzeit Gegenstand klinischer Phase-I-Studien ist.

Dabei ist die Auswahl eines geeigneten TZR bzw. die Auswahl eines Antigens entscheidend. Aufgrund des positiven Einflusses einer HLA-DPB1-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger auf das Rezidivrisiko nach allo-HSZT (siehe Kapitel 1.6), rückte das HLA-DPB1 als Zielstruktur des GvL-Effekts in den Fokus. (48) In Vorarbeiten wurden verschiedene HLA-DPB1-spezifische T-Zellen generiert.

Dabei ließen Vorexperimente mit dem 11G1 T-Zell-Klon vermuten, dass es sich beim T-Zell-Rezeptor dieser T-Zelle um einen hämatopoese-spezifischen Rezeptor handeln könnte. Andere HLA-DPB1-spezifische T-Zell-Klone wurden auch durch Erkennung des Antigens auf nicht-hämatopoetischen Zellen (Fibroblasten) aktiviert. Da HLA-DP

in entzündeten Geweben auch auf der Zelloberfläche anderer Körperzellen erscheint, stellt diese Eigenschaft ein potenzielles Risiko für die Entwicklung einer GvHD dar. (21) Beim 11G1-TZR war in Vorexperimenten mit dem ursprünglichen T-Zell-Klon keine Reaktivität gegen Fibroblasten festzustellen. In dieser Arbeit sollten weitere Experimente zur Charakterisierung des 11G1-TZR durchgeführt werden. Im Zentrum stand dabei die Frage, ob es sich um einen hämatopoese-spezifischen Rezeptor und damit um eine zielgerichtete Therapieoption für Patienten mit therapierefraktärer akuter myeloischer Leukämie bzw. Hochrisiko-AML handeln könnte.

Die Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert und in den Kontext der aktuellen Forschung und der Therapie der AML eingeordnet werden.

4.1 Oberflächenexpression des 11G1-TZR

Die funktionelle Aktivität einer mit einem TZR transfizierten T-Zelle hängt unter anderem von der Oberflächendichte des eingebrachten Rezeptors ab. (71) Deshalb spielt die Oberflächenexpression eine wichtige Rolle für den Einsatz eines TZR.

Damit ein T-Zell-Rezeptor an der Oberfläche einer Zelle exprimiert werden kann, muss ein stabiler Komplex aus mehreren Untereinheiten gebildet werden. Dazu zählen neben der α - und β -Kette auch der CD3-Korezeptor. Dadurch dass der endogene und der eingebrachte Rezeptor um den CD3-Korezeptor konkurrieren, ist der Korezeptor ein limitierender Faktor für Oberflächenexpression des TZR. Eine Möglichkeit, die Expression zu verbessern besteht deshalb in einem knock-out des endogenen TZR. Dafür stehen Methoden wie CRISPR/Cas oder Zinkfingernukleasen zur Verfügung (72, 73). Mit Hilfe dieser Verfahren können gezielt die Genabschnitte, die für den endogenen TZR kodieren aus dem Genom herausgeschnitten werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein knock out des endogenen TZR die Oberflächenexpression des transfizierten TZR erhöhen kann (74, 75)

Ein weiterer Aspekt, der einen Einfluss auf die Oberflächenexpression eines eingebrachten T-Zellrezeptors hat, ist die Möglichkeit zur Fehlpaarung mit endogenen TZR-Ketten. Dadurch sinkt die Anzahl der spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche, was die Avidität erniedrigt. (33) Der in Kapitel 3.2 durchgeführte

Versuch mit dem pp65-TZR konnte zeigen, dass beim 11G1-TZR auch Fehlpaarungen mit einem anderen T-Zell-Rezeptor entstehen können. Einschränkend muss erwähnt werden, dass diese Versuche im künstlichen Jurkat76-System durchgeführt wurden. Beim Einbringen in T-Zellen mit endogenem TZR liegt jedoch die Vermutung nahe, dass auch hier sich die Ketten des 11G1-TZR mit dem endogenen α - und β -Ketten zusammenlagern und die Oberflächenexpression des 11G1-TZR vermindern könnte. Dabei könnten Rezeptoren entstehen, deren Reaktivität schwer vorauszusagen ist. Es könnten dadurch auch Autoimmunreaktionen getriggert werden. (76) Beim durchgeführten Versuch mit Jurkat76-Zellen lag allerdings keine Konkurrenzsituation vor, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, wie häufig Fehlpaarungen mit endogenen Ketten auftreten würden. Eine Möglichkeit, solche Fehlpaarungen zu vermeiden, besteht in der Entwicklung eines Einzelketten-TZR, der nur mit einer Kette funktional ist oder des oben genannten knock-out des endogenen TZR. (77)

4.2 Vor- und Nachteile einer Murinisierung

Die ersten funktionellen Tests des 11G1-TZR zeigten gegenüber dem zum Vergleich verwendeten 11C12-TZR eine schwächere Erkennung von AML-Blasten. Beim 11C12-TZR wurden mehrere Modifikationen vorgenommen, um die Expression und damit die Funktionalität zu erhöhen. Den größten Erfolg brachte dabei der Austausch der konstanten humanen Domäne gegen eine konstante murine Domäne. (62) Die konstanten Domänen von Mensch und Maus zeigen zwar einen hohen Grad an Homologie, aber auch kleine Unterschiede beeinflussen die bevorzugte Kettenpaarung und die Stabilität des TZR/CD3-Komplexes. (78)

TZR mit einer konstanten murinen Domäne konkurrieren erfolgreicher um den endogenen CD3-Komplex. Außerdem treten weniger Fehlpaarungen mit endogenen T-Zell-Ketten auf, da murinisierte TZR-Ketten bevorzugt mit ihren ebenfalls murinen Gegenstücken dimerisieren. (67)

Auch beim 11G1-TZR konnte durch den Austausch der konstanten humanen Domäne durch eine konstante murine TZR-Domäne eine Verbesserung der Expression und der T-Zell-Aktivierung erreicht werden. Zudem wurde, wie auch beim 11C12-TZR, eine Kodonoptimierung durchgeführt. Dabei werden selten vorkommende Kodons,

zugunsten solcher die häufiger vorkommen, ausgetauscht, ohne eine Änderung der Aminosäuresequenz zu verursachen. (67)

Die Modifikationen der Gensequenz des T-Zellrezeptors bergen ein gewisses Risiko. Durch das Einbringen von fremden, im Falle des 11G1_{chim} murinen Genmaterials, besteht die Gefahr Immunreaktionen hervorzurufen. Dadurch kann die Lebensdauer einer T-Zelle, die mit dem modifizierten TZR ausgestattet wurde, eingeschränkt sein. (79) Die Präkonditionierung könnte allerdings eine unerwünschte Abstoßung von genetisch modifizierten Lymphozyten, die murine TZR-Gene exprimieren, unterdrücken. (68)

Alternativ können auch nur die Aminosäuren ausgetauscht werden, die für die verbesserte Oberflächenexpression verantwortlich sind. Dieses Konzept wird als Minimalmurinisierung bezeichnet. Sommermeyer et. al. und Bialer et. al. haben solche Rezeptorvarianten mit einer Minimalmurinisierung entwickelt, um das Risiko einer unerwünschten Immunreaktion zu reduzieren. (80, 81)

4.3 Erkennung und Lyse von AML-Blasten

Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen gesunder Spender, die mit dem 11G1-TZR transfiziert wurden, in der Lage sind HLA-DPB1 03:01⁺ AML-Blasten *in vitro* spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Die Experimente konnten zeigen, dass der Rezeptor sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺ T-Zellen zum Einsatz kommen kann.

Diese spezifische Erkennung ist abhängig vom Vorkommen von HLA-DP auf der Zelloberfläche der AML-Blasten. In Experimenten konnte allerdings beobachtet werden, dass keine direkte Korrelation zwischen HLA-DP-Expression und der Erkennung bzw. Lyse durch transfizierte T-Zellen besteht. (62, 82)

Ein denkbare Problem bei der Verwendung von HLA-DP als Zielstruktur könnte die Immunevasion darstellen. Untersuchungen konnten zeigen, dass Blasten durch den Selektionsdruck nach allogener Stammzelltransplantation HLA-DP herunterregulieren. Die Autoren konnten allerdings auch zeigen, dass diesem Effekt durch Gabe von IFN- γ entgegengewirkt werden kann. (83, 84)

4.4 Reaktivität des 11G1-TZR gegen nicht-hämatopoetische Zellen

Die Reaktivität des 11G1-TZR wurde zunächst gegen primäre Fibroblasten getestet. Diese eignen sich als Modellzelllinie, um eine potenzielle GvH-Reaktivität genauer zu untersuchen.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, ist HLA-DP als MHC-II-Molekül konstitutiv exprimiert auf verschiedenen Immunzellen, wie zum Beispiel B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen. Eine Oberflächenexpression kann aber auch auf epithelialen oder endothelialen Zellen durch Stimulation mit IFN- γ induziert werden. Im inflammatorischen Milieu, zum Beispiel nach Chemotherapie, Bestrahlung oder während einer Infektion, exprimieren Fibroblasten und andere Körperzellen HLA-DP. (59)

Im Gegensatz zum 11C12-TZR und den Ergebnissen von Rutten und Kollegen, wurde beim 11G1_{wt}-TZR keine Aktivierung durch Kontakt mit Fibroblasten, die mit IFN- γ behandelt wurden, festgestellt. (63, 85) Die vermutete Hämatopoese-Spezifität wurde in Frage gestellt durch Experimente mit dem chimärisierten Rezeptor. Der 11G1_{chim}-TZR zeigte auch eine Erkennung von Fibroblasten, die HLA-DPB1*03:01 auf ihrer Oberfläche exprimierten.

Neben Fibroblasten wurden noch verschiedene weitere Zelllinien untersucht, um ein breiteres Repertoire an Geweben abzudecken und Aufschluss über die Gewebespezifität des 11G1-TZR zu erhalten. Dabei handelte es sich nicht um primäre Zellen, sondern um Zelllinien, die zum Beispiel aus humanem Melanom- und Kolonkarzinomgewebe bzw. aus verschiedenen xenogenen Geweben stammen. (siehe Abbildung 15) Da die verwendeten Zelllinien nicht HLA-DPB1*03:01⁺ waren und durch IFN- γ -Behandlung nicht alle zuverlässig HLA-DP exprimierten, musste die Zellen mittels Elektroporation mit HLA-DP ausgestattet werden.

4.5 Vergleich der Methoden zur Induktion einer HLA-DP-Expression

Durch Elektroporation wurden deutlich höhere Expressionen von HLA-DP erreicht als durch Behandlung der Zellen mit IFN- γ . Diese Expressionsunterschiede hatten Auswirkungen auf die Erkennung der Zellen durch den 11G1-TZR. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die mit dem 11G1_{wt}-TZR transfiziert wurden, zeigten keine HLA-DPB1*03:01-spezifische Erkennung der IFN- γ behandelten Fibroblasten. Dagegen wurden die Fibroblasten, die durch Elektroporation mit HLA-DP ausgestattet von CD4⁺ T-Zellen mit dem 11G1_{wt}-TZR erkannt. (siehe Abbildung 17)

Unklar ist, wie hoch die IFN- γ -Konzentrationen und damit auch die HLA-DP-Expression *in vivo* im entzündeten Gewebe ist. Vermutlich handelt es sich bei der durch Elektroporation erzeugten Oberflächenexpression von HLA-DP, um unphysiologisch hohe Werte, die im lebenden Organismus so nicht vorkommen. Deswegen sollten geeignete *in vivo* Experimente durchgeführt werden, um das GvHD-Potenzial des 11G1-TZR besser einschätzen zu können.

Zu Beginn der Arbeit bestand aufgrund der Vorexperimente die Vermutung, dass es sich beim 11G1-TZR um einen Rezeptor mit einer Hämatopoese-Spezifität handelt. Einige der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen allerdings, dass der 11G1-TZR unter bestimmten Umständen auch nicht-hämatopoetische Zellen erkennt. Eine Erhöhung der Expression des 11G1-TZR (z.B. durch Chimärisierung) oder eine höhere Oberflächenexpression von HLA-DP (Elektroporation statt Behandlung mit IFN- γ) führten zu einer spezifischen T-Zell-Aktivierung. Man könnte daher eher von einer Hämatopoese-Präferenz des 11G1-TZR sprechen, denn bei geringerer (aber vorhandener) HLA-DP-Expression konnte meist keine oder allenfalls eine sehr geringe Aktivierung der T-Zellen, die mit dem 11G1-TZR ausgestattet wurden, registriert werden.

Ein wesentlicher Faktor für die funktionellen Eigenschaften der T-Zellen ist deren funktionelle Avidität. Diese wird in erster Linie durch die Affinität zwischen dem TZR und seinem definierten HLA/Peptidkomplex sowie der Oberflächenexpression des TZR bestimmt. (86)

4.6 Varianten zur Einbringung des T-Zellrezeptors in Zielzellen

Durch die Menge der eingebrachten RNA und ihre Halbwertszeit ist die TZR-Expression nach Elektroporation auf wenige Tage begrenzt. (62, 87, 88) Das kann dazu führen, dass für eine klinische Anwendung die Zellen mehrfach appliziert werden müssen und sich keine Langzeit-Gedächtnisfunktion ausbilden kann. (88)

Alternativ besteht die Möglichkeit den TZR über retrovirale oder lentivirale Transduktion in die Spenderzellen einzubringen. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass die DNA stabil ins Genom der Spender-T-Zelle eingebaut wird und somit langfristig einen Therapieeffekt im Körper erzielen kann. (78)

Bei anderen Erkrankungen sind T-Zellprodukte für die klinische Anwendung bereits zugelassen, wie beispielsweise die CD19 CAR-T-Zelltherapie bei refraktären/rezidierten Non-Hodgkin-Lymphomen oder bei der akuten lymphatischen B-Zell-Leukämie. (89)

Durch die stabile Integration des 11G1-TZR in die T-Zellen ist eine Steuerung der Therapie erschwert. Wenn im Körper des Patienten ein inflammatorisches Milieu vorliegt und der Rezeptor durch die HLA-DP-Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen off-target Reaktionen verursacht, klingt der Effekt nicht schnell wieder ab, sondern könnte dauerhaft bestehen bleiben und gegebenenfalls massive Nebenwirkungen hervorrufen. (90)

Gut geeignet ist die TZR-RNA-Elektroporation in erster Linie für *in vitro* Versuche, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Damit kann einfach und schnell eine Expression verschiedener Oberflächenmolekülen erreicht werden.

4.7 Klinische Anwendung des 11G1-TZR

Es konnte gezeigt werden, dass Spender-T-Zellen, die mit dem 11G1-TZR ausgestattet wurden, in der Lage sind primäre AML-Blasten *in vitro* zu erkennen und zu lysieren. Für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie bedeutet dies, dass grundsätzlich die Möglichkeit besteht mit diesem TZR eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln.

Eine solche Therapie könnte bei Patienten, die HLA-DPB1*03:01 positiv sind zum Einsatz kommen. Dies trifft auf ca. 10 % der kaukasischen Bevölkerung zu. (57)

Experimente mit Fibroblasten und anderen Zelllinien zeigten, dass grundsätzlich auch nicht-hämatopoetische Körperzellen, in Abhängigkeit von der HLA-DP-Oberflächenexpression, durch den 11G1-TZR erkannt werden können. Für den klinischen Einsatz bedeutet das, dass ein gewisses Potential zur Auslösung einer GvHD besteht. Berücksichtigt werden muss, dass bei AML-Patienten sich aufgrund von Chemotherapie, Bestrahlung und/oder Neigung zu Infektionen besonders häufig inflammatorische Prozesse abspielen. (91)

Zur Steigerung der Sicherheit einer adoptiven T-Zelltherapie könnten verschiedene Mechanismen zum Ausschalten der T-Zellen, die mit dem 11G1-TZR ausgestattet wurden, eingesetzt werden. Im Falle des Auftretens von unerwünschten Nebenwirkungen könnten die Zellen so eliminiert werden. Eine irreversible Eliminierung der Zellen ist zum Beispiel mit Hilfe einer induzierbaren Caspase-9 möglich. Durch das Molekül AP1903, das zu einer chemisch induzierten Dimerisierung der modifizierten Caspase-9 führt, werden die Zellen in die Apoptose geschickt. (92, 93) Eine weitere Option besteht darin, Zellen mit einem trunktierten, nicht-funktionellen EGF-Rezeptor (für engl. epidermal growth factor) auszustatten. Eine Depletion der Zellen ist dann mit einem monoklonalen Antikörper wie Cetuximab möglich. Solche Suizidtechnologien haben den Nachteil, dass sie eine komplette Eradikation der modifizierten T-Zellen bewirken und somit einen frühzeitigen irreversiblen Abbruch des therapeutischen Effekts verursachen. (94, 95)

Eine weitere Möglichkeit mehr Kontrolle über die T-Zell-Therapie zu erzielen, besteht im Einbau eines On-Schalters, wie er bei CAR-T-Zellen schon getestet wurde. Durch ein kleines Molekül wird der T-Zell-Rezeptor aktiviert, ansonsten ist er inaktiv. (96)

Inwieweit sich der 11G1-TZR für eine klinische Anwendung eignet, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Insbesondere fehlen zur Beurteilung einer klinischen Anwendbarkeit Untersuchungen in geeigneten Tiermodellen, die auf die dargestellten *in vitro* Daten aufbauen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation bei Patienten mit AML sind vor allem die transplantierten T-Zellen für die Reaktivität gegen verbliebene Blasten (GvL-Effekt) verantwortlich. (30) Zusätzlich vermitteln sie auch die gefürchtete Komplikation der Graft-versus-Host-Disease, indem sie auch gesunde Körperzellen des Patienten angreifen. (35) Eine Trennung der beiden Effekte zu erreichen, wäre ein großer Erfolg für die Behandlung der AML.

Im Rahmen von Studien wurden die Auswirkungen verschiedener HLA-DP-Konstellationen zwischen Spender und Empfänger bei allogener Stammzelltransplantation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen HLA-DP-Inkompatibilität und geringerer Rezidivrate besteht. (48–50) Aufgrund dieser Ergebnisse rückte das HLA-DP als Zielstruktur des GvL-Effekts in den Fokus der Forschung.

In Vorarbeiten konnten allo-HLA-DPB1-spezifische, leukämiereaktive T-Zellen gewonnen werden. (61) Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Spezifität, durch einen Gentransfer in T-Zellen eines Spenders, übertragen werden kann. (63)

Der 11G1-T-Zellklon konnte in Vorversuchen spezifisch HLA-DPB1*03:01⁺ AML-Blasten erkennen. (61) Gegenüber HLA-DPB1*03:01⁺ Fibroblasten, die als GvHD-Modellzelllinie eingesetzt wurden, zeigte der T-Zellklon dagegen keine Reaktivität. Daraus ergab sich die Hypothese, dass es sich beim 11G1-TZR um einen Rezeptor mit Hämatopoese-Spezifität handeln könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Vermutung überprüft und der 11G1-TZR genauer charakterisiert.

Zunächst wurde das funktionelle Kettenpaar des 11G1-TZR identifiziert. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender, die mit dem 11G1-TZR transfiziert wurden, in der Lage sind HLA-DPB1*03:01⁺ AML-Blasten *in vitro* spezifisch zu erkennen.

Im nächsten Schritt wurde eine chimäre Form des 11G1-TZR funktionell getestet, wodurch eine verbesserte Oberflächenexpression erzielt werden konnte. Auch im Hinblick auf Erkennung und Lyse von AML-Blasten konnte durch die Murinisierung der

Gensequenz des Rezeptors die Funktionalität der transfizierten T-Zellen erhöht werden.

Experimente mit Fibroblasten und weiteren GvHD-Modellzellreihen zeigten, dass der 11G1-TZR auch nicht-hämatopoetische Zellen erkennen kann. Eine Erhöhung der Expression des 11G1-TZR (z.B. durch die Chimärisierung) oder eine höhere Oberflächenexpression von HLA-DP (Elektroporation der Zielzellen statt Behandlung mit IFN- γ) führen zu einer spezifischen T-Zell-Aktivierung. Man könnte daher eher von einer Hämatopoese-Präferenz des 11G1-TZR ausgehen, denn bei geringerer (aber vorhandener) HLA-DP-Expression der Zielzellen konnte meist keine oder allenfalls eine sehr geringe Aktivierung der T-Zellen, die mit dem 11G1-TZR ausgestattet wurden, detektiert werden.

Im Zusammenhang mit der HLA-DP-Expression der Zielzellen wurde auch die Frage aufgeworfen, wie *in vitro* eine möglichst realistisches Entzündungsmilieu simuliert werden kann. Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Elektroporation von HLA-DP unphysiologisch hohe Expressionsfrequenzen von HLA-DP erreicht werden und die Behandlung mit IFN- γ besser geeignet ist, um entzündetes Gewebe im menschlichen Körper *in vitro* nachzubilden.

Zur besseren Abschätzung des GvHD-Risikos des 11G1-TZR sind weitere Versuche *in vivo* notwendig. Vor einer klinischen Anwendung müssten im Tiermodell eine gute Verträglichkeit und Effektivität bestätigt werden. Außerdem könnte die Entwicklung von Mechanismen zum Ein- bzw. Ausschalten des TZR einen Beitrag dazu leisten, die Sicherheit des 11G1-TZR zu verbessern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der 11G1-TZR in der Lage ist HLA-DP spezifisch AML-Blasten zu erkennen und zu lysieren. Damit käme er theoretisch für den Einsatz in der adoptiven Immuntherapie der AML in Frage. Ein klinischer Einsatz wäre bei positiven Ergebnissen aufgrund der Verteilung des HLA-DPB1*03:01 in der Bevölkerung, bei circa 10% der Patienten mit AML denkbar. Dadurch, dass die Reaktivität nicht auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist, besteht allerdings auch das Risiko eine GvHD zu induzieren.

Daten dieser Arbeit wurden bereits als Teil der folgenden Publikation veröffentlicht:

Klobuch S, Hammon K, Vatter-Leising S, **Neidlinger E**, Zwerger M, Wandel A, Neuber L, Heilmeier B, Fichtner R, Mirbeth C, Herr W, Thomas S. HLA-DPB1 Reactive T Cell Receptors for Adoptive Immunotherapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cells* 2020; 9(5). doi: 10.3390/cells9051264.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AK.....	<i>Antikörper</i>
allo-HSZT	<i>allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation</i>
AML	<i>akute myeloische Leukämie</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
chim.....	<i>chimär</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DLI.....	<i>donor lymphocyte infusion</i>
E. coli.....	<i>Escherichia coli</i>
EBV-LCL.....	<i>Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGFR.....	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
FAB.....	<i>French-American-British</i>
FACS.....	<i>fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie</i>
FCS	<i>fetales Kälberserum</i>
FITC.....	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
gam	<i>goat anti mouse</i>
GvH	<i>Graft versus Host</i>
GvHD.....	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvL.....	<i>Graft versus leukemia</i>
HLA	<i>humane Leukozytenantigene</i>
HS	<i>Humanserum</i>
IFN.....	<i>Interferon</i>
IL.....	<i>Interleukin</i>
ITAM.....	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MFI	<i>mediane Fluoreszenzaktivität</i>

mHag.....	<i>minor histocompatibility antigens</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA.....	<i>messenger Ribbonucleinsäure</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphate-buffered saline</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
UpM.....	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
WHO.....	<i>World Health Organization</i>
wt.	<i>Wildtyp</i>
WT-1.....	<i>Wilms-Tumor-1-Antigen</i>
ZAP-70	<i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
ZNS	<i>zentrales Nervensystem</i>

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der adoptiven TZR-Therapie	17
Abbildung 2: Frequenzen der HLA-DPA1 und HLA-DPB1-Allele in der kaukasischen Bevölkerung.....	19
Abbildung 3: Induktion der HLA-DP-Expression bei Inflammation.....	20
Abbildung 4: Expression des 11G1- bzw. 11C12-TZR auf Jurkat76-Zellen.....	39
Abbildung 5: Expression der verschiedenen TZR-Kombinationen auf Jurkat76-Zellen	41
Abbildung 6: Erkennung von LCL-Zellen durch den 11G1-TZR in CD4 ⁺ T-Zellen, Vergleich der α 8-3 und α 13-2-Kette	42
Abbildung 7: Erkennung von AML-Blasten	44
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kettenaustausches beim 11G1 _{chim}	46
Abbildung 9 Expression des 11G1 _{chim} auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	47
Abbildung 10: IFN- γ -Ausschüttung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ bei Kontakt mit primären AML-Blasten und EBV-LCL	48
Abbildung 11: ⁵¹ Chrom-Freisetzungsanalysen	50
Abbildung 12: Expression von HLA-DP auf Fibroblasten nach Behandlung mit IFN- γ	51

Abbildung 13: IFN- γ -Ausschüttung elektroporierter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen bei Kontakt mit Fibroblasten mit bzw. ohne vorherige IFN- γ -Behandlung	53
Abbildung 14: Expression von HLA-DP nach Elektroporation verschiedener humaner und xenogener Zelllinien.....	54
Abbildung 15: IFN- γ -Ausschüttung von transfizierten T-Zellen bei Kontakt mit humanen und xenogenen Zelllinien mit und ohne HLA-DP-Expression	55
Abbildung 16: Oberflächenexpression von HLA-DP auf Fibroblasten nach IFN- γ -Behandlung	56
Abbildung 17: IFN- γ -Ausschüttung von TZR-transfizierten T-Zellen gegenüber IFN- γ vorbehandelten bzw. HLA-DP transfizierten Fibroblasten	57
Abbildung 18: Oberflächenexpression von HLA-DP auf den Zelllinien SK5mel sowie HCT116 nach IFN- γ -Behandlung bzw. Elektroporation mit HLA-DP	59
Abbildung 19: IFN- γ -Ausschüttung von transfizierten T-Zellen bei Kontakt mit den Zelllinien Sk5mel und HCT116 mit HLA-DP-Expression, welche durch IFN- γ oder Elektroporation induziert wurde	60

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Einteilung der akuten myeloischen Leukämie	7
Tabelle 2: Risikogruppen der AML nach European LeukemiaNet (ELN).....	8
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.....	32
Tabelle 4: Verwendete PBMC	33
Tabelle 5: Verwendete EBV-LCL.....	33
Tabelle 6: Verwendete AML-Blasten	33
Tabelle 7: Verwendete Fibroblasten	33

7 Literatur

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368(9550):1894–907. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69780-8.
2. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
3. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14):1051–62. doi: 10.1056/NEJM199909303411407.
4. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107(9):2099–107. doi: 10.1002/cncr.22233.
5. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A-S, Hagberg O, Höglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* 2012; 119(17):3890–9. doi: 10.1182/blood-2011-12-379008.
6. Röllig C, Ayuketang F, Braess J, Heuser M, Manz M, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk R, Zebisch A. Akute Myeloische Leukämie (AML) — *Onkopedia*; 2023 [Stand: 03.10.2023]. Verfügbar unter: https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@_@view/html/index.html#litID0EJIBG.
7. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage, in Zusammenarbeit mit der Charité. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016.
8. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med* 2016; 5(3). doi: 10.3390/jcm5030033.
9. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1703–19. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1.
10. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
11. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood* 2022. doi: 10.1182/blood.2022016867.
12. Röllig C, Kramer M, Schliemann C, Mikesch J-H, Steffen B, Krämer A et al. Does time from diagnosis to treatment affect the prognosis of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia? *Blood* 2020; 136(7):823–30. doi: 10.1182/blood.2019004583.

13. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology* 2014; 15(9):986–96. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70281-5.
14. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med* 2017; 377(5):454–64. doi: 10.1056/NEJMoa1614359.
15. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2018; 36(26):2684–92. doi: 10.1200/JCO.2017.77.6112.
16. Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017; 10(4):245–51. doi: 10.1016/j.hemonc.2017.05.021.
17. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(6):778–85. doi: 10.1038/bmt.2016.18.
18. Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med* 2003; 54:491–512. doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152456.
19. Kolb H-J, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103(3):767–76. doi: 10.1182/blood-2003-02-0342.
20. 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. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.69.
21. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(12):823–36. doi: 10.1038/nri3084.
22. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res* 2016; 76(22):6445–51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1311.
23. Tiercy J-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica* 2016; 101(6):680–7. doi: 10.3324/haematol.2015.141119.

24. Murphy. *Janeway Immunologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
25. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res* 2017; 37(4):1547–55. doi: 10.21873/anticancer.11483.
26. Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int J Hematol* 2015; 101(5):452–66. doi: 10.1007/s12185-015-1785-1.
27. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324(10):667–74. doi: 10.1056/NEJM199103073241005.
28. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354(17):1813–26. doi: 10.1056/NEJMra052638.
29. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2017; 129(1):30–7. doi: 10.1182/blood-2016-07-686642.
30. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol* 2008; 142(6):877–88. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07260.x.
31. Little M-T, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3):231–8. doi: 10.1038/nrc748.
32. Fleischhauer K, Shaw BE. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood* 2017; 130(9):1089–96. doi: 10.1182/blood-2017-03-742346.
33. Fujiwara H. Adoptive immunotherapy for hematological malignancies using T cells gene-modified to express tumor antigen-specific receptors. *Pharmaceuticals (Basel)* 2014; 7(12):1049–68. doi: 10.3390/ph7121049.
34. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78(8):2120–30.
35. Falkenburg JHF, Heslop HE, Barrett AJ. T cell therapy in allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(1 Suppl 1):136–41. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.10.022.
36. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(5):371–80. doi: 10.1038/nrc1365.
37. Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, Sorrow ML, Blume K, Niederwieser D et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2013; 31(12):1530–8. doi: 10.1200/JCO.2012.45.0247.
38. Orti G, Barba P, Fox L, Salamero O, Bosch F, Valcarcel D. Donor lymphocyte infusions in AML and MDS: Enhancing the graft-versus-leukemia effect. *Exp Hematol* 2017; 48:1–11.

39. Hudecek M, Bartsch K, Tschiedel S, Niederwieser D. Kleine Antigene - grosse Wirkung. Die Rolle von Minor-Histokompatibilitätsantigenen bei der allogenen Blutstammzelltransplantation. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133(28-29):1511–6. doi: 10.1055/s-2008-1081100.
40. Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H et al. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol* 2017; 8:496. doi: 10.3389/fimmu.2017.00496.
41. Bröker B. *Grundwissen Immunologie*: Springer Spektrum; 2019.
42. Houot R, Schultz LM, Marabelle A, Kohrt H. T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(10):1115–22. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0190.
43. Dotti G. Control of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: integrating transplantation with genetically modified T cell therapies. *Curr Opin Hematol* 2015; 22(6):489–96. doi: 10.1097/MOH.000000000000177.
44. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86(5):2041–50.
45. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21(2):205–22. doi: 10.1016/j.beha.2008.02.007.
46. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314(5796):126–9. doi: 10.1126/science.1129003.
47. 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. doi: 10.1007/s12185-013-1493-7.
48. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, Madrigal JA, Begovich AB, Horowitz MM et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2007; 110(13):4560–6. doi: 10.1182/blood-2007-06-095265.
49. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood* 2015; 125(7):1189–97. doi: 10.1182/blood-2014-10-604785.
50. Gaschet J, Gallot G, Ibisch C, Lim A, Even J, Vivien R et al. Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1*1001

- mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(4):385–92. doi: 10.1038/sj.bmt.1701336.
51. Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon J-D et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *The Lancet Oncology* 2012; 13(4):366–74. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9.
 52. Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 2015; 373(7):599–609. doi: 10.1056/NEJMoa1500140.
 53. Zino E, Frumento G, Markt S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S et al. 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. doi: 10.1182/blood-2003-04-1279.
 54. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009; 114(7):1437–44. doi: 10.1182/blood-2009-01-200378.
 55. Büchler T, Gallardo D, Rodríguez-Luaces M, Pujal JM, Grañena A. Frequency of HLA-DPB1 disparities detected by reference strand-mediated conformation analysis in HLA-A, -B, and -DRB1 matched siblings. *Hum Immunol* 2002; 63(2):139–42. doi: 10.1016/s0198-8859(01)00376-7.
 56. Nomura N, Ota M, Kato S, Inoko H, Tsuji K. Severe acute graft-versus-host disease by HLA-DPB1 disparity in recombinant family of bone marrow transplantation between serologically HLA-identical siblings: an application of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. *Hum Immunol* 1991; 32(4):261–8. doi: 10.1016/0198-8859(91)90089-r.
 57. Hollenbach JA, Madbouly A, Gragert L, Vierra-Green C, Flesch S, Spellman S et al. A combined DPA1~DPB1 amino acid epitope is the primary unit of selection on the HLA-DP heterodimer. *Immunogenetics* 2012; 64(8):559–69. doi: 10.1007/s00251-012-0615-3.
 58. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
 59. Stevanovic S, van Bergen CAM, van Luxemburg-Heijs SAP, van der Zouwen B, Jordanova ES, Kruisselbrink AB et al. 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. doi: 10.1182/blood-2012-12-470872.
 60. Herr W, Eichinger Y, Beshay J, Bloetz A, Vatter S, Mirbeth C et al. HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell

immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia* 2017; 31(2):434–45. doi: 10.1038/leu.2016.210.

61. Vatter S, Schmid M, Gebhard C, Mirbeth C, Klobuch S, Rehli M et al. In-vitro blockade of the CD4 receptor co-signal in antigen-specific T-cell stimulation cultures induces the outgrowth of potent CD4 independent T-cell effectors. *J Immunol Methods* 2018; 454:80–5. doi: 10.1016/j.jim.2017.11.006.
62. Vatter S. HLA-DP-spezifische T-Zell-Rezeptoren als Immuntherapeutika zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie; 2018.
63. Klobuch S, Hammon K, Vatter-Leising S, Neidlinger E, Zwerger M, Wandel A et al. HLA-DPB1 Reactive T Cell Receptors for Adoptive Immunotherapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cells* 2020; 9(5). doi: 10.3390/cells9051264.
64. Thomas S, Klobuch S, Podlech J, Plachter B, Hoffmann P, Renzaho A et al. Evaluating Human T-Cell Therapy of Cytomegalovirus Organ Disease in HLA-Transgenic Mice. *PLoS Pathog* 2015; 11(7):e1005049. doi: 10.1371/journal.ppat.1005049.
65. Thomas S, Klobuch S, Besold K, Plachter B, Dörrie J, Schaft N et al. 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. doi: 10.1002/eji.201242666.
66. Knies D, Klobuch S, Xue S-A, Birtel M, Echchannaoui H, Yildiz O et al. An optimized single chain TCR scaffold relying on the assembly with the native CD3-complex prevents residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells. *Oncotarget* 2016; 7(16):21199–221. doi: 10.18632/oncotarget.8385.
67. Thomas S, Stauss HJ, Morris EC. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Immunology* 2010; 129(2):170–7. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03227.x.
68. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res* 2006; 66(17):8878–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1450.
69. Geiger TL, Rubnitz JE. New approaches for the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Discov Med* 2015; 19(105):275–84.
70. Nikiforow S, Alyea EP. Maximizing GVL in allogeneic transplantation: role of donor lymphocyte infusions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014(1):570–5. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.570.
71. Heemskerk MHM, Hagedoorn RS, van der Hoorn MAWG, van der Veken LT, Hoogeboom M, Kester MGD et al. Efficiency of T-cell receptor expression in dual-

- specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood* 2007; 109(1):235–43. doi: 10.1182/blood-2006-03-013318.
72. Stauss HJ, Cesco-Gaspere M, Thomas S, Hart DP, Xue S-A, Holler A et al. Monoclonal T-cell receptors: new reagents for cancer therapy. *Mol Ther* 2007; 15(10):1744–50. doi: 10.1038/sj.mt.6300216.
 73. Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, Willier S, Rataj F, Schober K et al. Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood* 2020; 136(12):1407–18. doi: 10.1182/blood.2020005185.
 74. Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. *Blood* 2018; 131(3):311–22. doi: 10.1182/blood-2017-05-787598.
 75. Morton LT, Reijmers RM, Wouters AK, Kweekel C, Remst DFG, Pothast CR et al. Simultaneous Deletion of Endogenous TCR $\alpha\beta$ for TCR Gene Therapy Creates an Improved and Safe Cellular Therapeutic. *Mol Ther* 2020; 28(1):64–74. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.10.001.
 76. Schumacher TNM. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(7):512–9. doi: 10.1038/nri841.
 77. Voss R-H, Thomas S, Pfirschke C, Hauptrock B, Klobuch S, Kuball J et al. Coexpression of the T-cell receptor constant α domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood* 2010; 115(25):5154–63. doi: 10.1182/blood-2009-11-254078.
 78. Govers C, Sebestyén Z, Coccoris M, Willemsen RA, Debets R. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends Mol Med* 2010; 16(2):77–87. doi: 10.1016/j.molmed.2009.12.004.
 79. Drysdale CM, Tisdale JF, Uchida N. Immunoresponse to Gene-Modified Hematopoietic Stem Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020; 16:42–9. doi: 10.1016/j.omtm.2019.10.010.
 80. Bialer G, Horovitz-Fried M, Ya'acobi S, Morgan RA, Cohen CJ. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *J Immunol* 2010; 184(11):6232–41. doi: 10.4049/jimmunol.0902047.
 81. Sommermeyer D, Uckert W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol* 2010; 184(11):6223–31. doi: 10.4049/jimmunol.0902055.
 82. Ibisch C, Gallot G, Vivien R, Diez E, Jotereau F, Garand R et al. Recognition of leukemic blasts by HLA-DPB1-specific cytotoxic T cell clones: a perspective for

- adjuvant immunotherapy post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(11):1153–9. doi: 10.1038/sj.bmt.1701768.
83. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, Riba M, Oliveira G, Bucci G et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med* 2019; 25(4):603–11. doi: 10.1038/s41591-019-0400-z.
 84. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, Miller CA, Chendamarai E, Duncavage EJ et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med* 2018; 379(24):2330–41. doi: 10.1056/NEJMoa1808777.
 85. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SAP, Griffioen M, Marijt EWA, Jedema I, Heemskerk MHM et al. HLA-DP as specific target for cellular immunotherapy in HLA class II-expressing B-cell leukemia. *Leukemia* 2008; 22(7):1387–94. doi: 10.1038/leu.2008.90.
 86. Kuball J, Dossett ML, Wolf M, Ho WY, Voss R-H, Fowler C et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* 2007; 109(6):2331–8. doi: 10.1182/blood-2006-05-023069.
 87. Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, Gattinoni L, Palmer DC, Restifo NP et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther* 2006; 13(1):151–9. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.07.688.
 88. Birkholz K, Hombach A, Krug C, Reuter S, Kershaw M, Kämpgen E et al. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther* 2009; 16(5):596–604. doi: 10.1038/gt.2008.189.
 89. Lu J, Jiang G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Mol Cancer* 2022; 21. doi: 10.1186/s12943-022-01663-0.
 90. Schaft N, Dörrie J, Müller I, Beck V, Baumann S, Schunder T et al. A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(9):1132–41. doi: 10.1007/s00262-005-0098-2.
 91. Vyas P, Appelbaum FR, Craddock C. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(1):8–15. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.026.
 92. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005; 105(11):4247–54. doi: 10.1182/blood-2004-11-4564.
 93. Zhou X, Brenner MK. Improving the safety of T-Cell therapies using an inducible caspase-9 gene. *Exp Hematol* 2016; 44(11):1013–9. doi: 10.1016/j.exphem.2016.07.011.

94. 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* 2015; 350(6258):aab4077. doi: 10.1126/science.aab4077.
95. Juillerat A, Marechal A, Filhol J-M, Valton J, Duclert A, Poirot L et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep* 2016; 6:18950. doi: 10.1038/srep18950.
96. Yu S, Yi M, Qin S, Wu K. Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity. *Mol Cancer* 2019; 18(1):125. doi: 10.1186/s12943-019-1057-4.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Simone Thomas für die Überlassung des interessanten Themas und ihre Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken. Vielen Dank auf für die konstruktive Kritik und die Möglichkeit an Kongressen und Fortbildungen teilzunehmen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Sebastian Klobuch für seinen unermüdlichen Einsatz und seine ansteckende Begeisterung. Ohne seine anschaulichen Erklärungen und Anleitung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank auch an das beste Laborteam, das ich mir wünschen hätte können. Danke für all eure praktische Unterstützung. Ihr habt es mir sehr leicht gemacht mich im Labor wohlfühlen.

Zuletzt möchte ich bei meinem Freund und meiner Familie für die Geduld und Unterstützung während des ganzen Studiums und darüber hinaus bedanken.

9 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

E. Neidlinger