

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Fakultät für Medizin**

**Forschungszentrum für krebskranke Kinder**

**Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin**

Generation transgener, antigen-spezifischer, allogener, HLA-A\*02:01 restringierter,  
zytotoxischer T-Zellen gerichtet gegen das für das Ewing Sarkom spezifische  
Antigen HOXD11

**Janna Henrieke Gerdes**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzende/r:**

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

**Prüfer der Dissertation:**

1. Priv.-Doz. Dr. Günther Richter
2. Prof. Dr. Stefan Burdach

Die Dissertation wurde am 11.03.2020 bei der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.10.2020  
angenommen.

Für Markus

# Inhaltsverzeichnis

|  | <b>Seite</b> |
|--|--------------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>6</b>     |
| 1.1. Ewing Sarkom  | 6            |
| 1.2. Adoptive T-Zelltherapie                                     | 9            |
| 1.3. Homöobox-Gen D11  | 14           |
| 1.4. Zielsetzung   | 15           |
| <br>   |              |
| <b>2. Material</b>   | <b>17</b>    |
| 2.1. Herstellerliste   | 17           |
| 2.2. Verbrauchsmaterialien                                       | 19           |
| 2.3. Geräte  | 20           |
| 2.4. Chemikalien und Reagenzien                                  | 21           |
| 2.5. Kits  | 22           |
| 2.6. Antikörper  | 23           |
| 2.7. Medien, Puffer und Lösungen                                 | 24           |
| 2.8. Primer  | 25           |
| 2.9. Zelllinien  | 28           |
| 2.10. HLA-Status lymphoblastoider Zelllinien                     | 29           |
| <br>   |              |
| <b>3. Methoden</b>   | <b>30</b>    |
| 3.1. Zellkulturmethoden  | 30           |
| 3.1.1. Kultivierung von Adhäsions- und Suspensionszelllinien     | 30           |
| 3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen                        | 31           |
| 3.2. Molekularbiologische Analysen                               | 31           |
| 3.2.1. Durchflusszytometrie                                      | 31           |
| 3.2.2. ELISpot   | 31           |
| 3.2.3. xCELLigence   | 32           |
| 3.3. Analyse des T-Zell-Rezeptor-V $\alpha$ $\beta$ -Repertoires | 33           |
| 3.3.1. RNS-Isolation   | 33           |
| 3.3.2. Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion        | 33           |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.3. Identifikation des $\alpha$ - und $\beta$ -Repertoires des T-Zellrezeptors mittels PCR                                       | 34 |
| 3.3.4. Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese   | 35 |
| 3.3.5. <i>In silico</i> -Analyse der variablen Bereiche der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette   | 36 |
| 3.3.6. Klonierung des T-Zellrezeptors   | 37 |
| 3.3.7. Mini- und Maxi-Plasmidpreparation  | 37 |
| 3.4. Isolation von T-Zell-Subpopulationen   | 38 |
| 3.4.1. Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)   | 38 |
| 3.4.2. Isolation von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen   | 39 |
| 3.4.3. Generierung von T-Gedächtniszellen mit Stammzeleigenschaften (T <sub>SCM</sub> )   | 39 |
| 3.5. Transduktion von T <sub>SCM</sub> mit HOXD11 <sup>2G12</sup> spezifischem T-Zellrezeptor                                       | 40 |
| 3.6. Statistik  | 40 |
| <b>4. Ergebnisse</b>  | 41 |
| 4.1. Vorversuche der Arbeitsgruppe Richter  | 41 |
| 4.1.1. Identifikation von HOXD11 als geeignetes Zielantigen   | 41 |
| 4.1.2. Auswahl eines geeigneten Peptidpitops mittels <i>in silico</i> -Analyse  | 42 |
| 4.1.3. Generierung HLA-A*02:01- und HOXD11-positiver T-Zellen und durchflusszytometrische Sortierung mittels Antikörper-Markierung  | 43 |
| 4.2. Auswahl eines geeigneten T-Zellklons   | 43 |
| 4.2.1. Peptidspezifität im Kontext von HLA-A*02:01  | 43 |
| 4.2.2. Kreuzreaktivität der T-Zellklone   | 45 |
| 4.3. Identifikation des T-Zellrezeptors   | 47 |
| 4.3.1. Sequenzanalyse der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette der T-Zellklone 2B1 und 2G12  | 47 |
| 4.3.2. Komplettierung der Sequenzen der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette mittels ImMunoGeneTics (IMGT) durch <i>in silico</i> -Analyse | 48 |
| 4.4. Peptidspezifität und Reaktivität des ausgewählten T-Zellklons 2G12   | 48 |
| 4.4.1. Durchflusszytometrie zur Bestätigung der Expression  | 48 |

|  |           |
|--|-----------|
| von HOXD11 <sup>50</sup> und CD8 in der T-Zellkultur   |           |
| 4.4.2. Peptidspezifität und Reaktivität des T-Zellklons 2G12<br>im Kontext von HLA-A*02:01   | 49        |
| 4.4.3. HLA-A*02:01 restringierte Peptiderkennung   | 50        |
| 4.4.4. T2-Zellen beladen mit HOXD11 <sup>50</sup> und Influenza  | 51        |
| 4.4.5. Nachweis der korrekten Peptidprozessierung durch<br>Transfektion von Cos7-Zellen  | 51        |
| 4.4.6. GranzymeB-Ausschüttung in Abhängigkeit von<br>Verhältnis der Effektor- zur Zielzelle  | 52        |
| 4.4.7. Inhibition des Wachstums von Zielzellen durch<br>T-Zellklon 2G12  | 53        |
| 4.4.8. Spezifizierung einer möglichen Kreuzreaktivität mittels<br>Alanin-Scan  | 53        |
| 4.5. Generation transgener, antigen-spezifischer,<br>allogener, HLA-A*02:01 restringierter, zytotoxischer<br>T-Zellen gerichtet gegen HOXD11         | 54        |
| 4.5.1. Erstellung eines HOXD11 <sup>50</sup> 2G12 T-Zellrezeptorkonstrukts<br>als Wildtyp und in codonoptimierter und minimalmurini-<br>sierter Form | 54        |
| 4.5.2. Generierung von HOXD11 <sup>50</sup> 2G12 transgenen,<br>zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen mit Stammzeleigen-<br>schaften (T <sub>SCM</sub> ) | 55        |
| <b>5. Diskussion</b>   | <b>56</b> |
| <b>6. Zusammenfassung</b>  | <b>64</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>   | <b>65</b> |
| <b>8. Danksagung</b>   | <b>81</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| ACT           | <i>Adoptive Cell Therapy</i> , Adoptive Zelluläre Therapie        |
| APC           | Antigenpräsentierende Zelle                                       |
| ATF1          | <i>Activating Transcription Factor 1</i>                          |
| BSA           | Bovines Serumalbumin  |
| CAR           | chimärer Antigenrezeptor  |
| cDNS          | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                              |
| CML           | chronische myeloische Leukämie                                    |
| DMEM          | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                           |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid  |
| dNTP          | Desoxynukleotidtriphosphate                                       |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                                      |
| ELISpot Assay | <i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>                            |
| ES            | Ewing Sarkom  |
| ETS           | E-twenty-six-specific   |
| EWSR1, EWS    | <i>Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1</i>                          |
| FACS          | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie |
| FCS           | <i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum                     |
| FLI1-Gen      | <i>Friend Leukemia Virus Integration 1</i>                        |
| GB            | GranzymeB   |
| HLA           | Humanes Leukozyten Antigen  |
| HOXD11        | Homeobox D11  |
| INF- $\gamma$ | Interferon-gamma  |
| LB            | <i>lysogeny broth</i> , ein Nährmedium                            |
| LCL           | <i>lymphoblastoid cell lines</i> , lymphoblastiode Zelllinien     |
| mAK           | monoklonaler Antikörper   |
| MHC           | <i>major histocompatibility complex</i>                           |
| PBMC          | Periphere mononukleäre Zellen                                     |
| PBS           | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung  |
| PCR           | Polymerasekettenreaktion  |
| qRT-PCR       | quantitative Real-Time PCR  |
| RNS           | Ribonukleinsäure  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| rpm               | <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute                            |
| RPMI              | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>  |
| RT                | Reverse Transkriptase   |
| T2 <sub>HOX</sub> | T2-Zellen mit HOXD11 <sup>50</sup> -Peptid  |
| T2 <sub>INF</sub> | T2-Zellen mit Influenza-Peptid  |
| TAE               | TRIS-Acetat-EDTA  |
| TAP               | <i>Transporter associated with antigen processing</i> , Antigen-Peptidtransporter |
| TIL               | Tumordinfiltrierende Lymphozyten  |
| T <sub>SCM</sub>  | T-Gedächtniszellen mit Stammzeleigenschaften                                      |
| TZM               | T-Zellmedium  |
| TZR               | T-Zellrezeptor  |
| WHO               | <i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation                    |

## 1. Einleitung

### 1.1. Ewing Sarkom

Das Ewing Sarkom (ES) ist nach dem Osteosarkom der zweithäufigste, primäre Knochentumor im Kindesalter und macht 2% der Krebserkrankungen unter Kindern und Jugendlichen aus. Mit einer Inzidenz von ca. 3 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr ist das ES zwar eine vergleichsweise seltene Erkrankung, jedoch stellen die Aggressivität, die frühe Metastasierung und das häufig sehr junge Erkrankungsalter Ärzte vor eine große Herausforderung (Bernstein, 2006; Potratz, 2012; Redini and Heymann, 2015). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 15 Jahren. Erkrankungen vor dem 5. Lebensjahr und nach dem 40. Lebensjahr sind sehr selten. Die Geschlechterverteilung zeigt eine leichte Tendenz zum männlichen Geschlecht mit einer Häufigkeit von 1:1,3 (w:m). Zudem scheint die weiße Bevölkerung deutlich häufiger betroffen als Asiaten oder Afrikaner (Bernstein, 2006; Houry, 2005).

Lange Zeit wurde das ES in verschiedene Subtypen von morphologisch heterogenen, malignen Tumoren eingeteilt. Hierzu gehörten das klassische ES, das extraskelettale ES, die Askin Tumore, welche sich im Bereich der Brustwand manifestieren, und die peripheren neuroektodermalen Tumore (PNET) mit typischer neuronaler Differenzierung (Houry, 2005; Potratz, 2012). Mittlerweile ist laut WHO die gemeinsame Terminologie „Ewing Sarkom“ vorgesehen, da es zwar unterschiedliche Differenzierungen mit zum Teil auch unterschiedlichen immunhistochemischen Merkmalen gibt, diese Sarkomentitäten aber auf eine gemeinsame molekulare Signatur zurückzuführen sind (Delattre, 1994).

Der größte Teil der ES im Kindes- und Jugendalters manifestiert sich an den Diaphysen der langen Röhrenknochen (insgesamt 46%), den flachen Beckenknochen (26%) oder der Brustwand (16%). Bei Erwachsenen hingegen ist die Prävalenz im extraskelettalen Weichteilgewebe erhöht. Bei 25% der Patienten ist die Erkrankung bereits bei Diagnosestellung metastasiert. Vorwiegend – in einem Drittel der Fälle – findet eine Metastasierung in die Lunge statt, gefolgt von isoliertem Knochen- oder auch Knochenmarksbefall oder einer Kombination aus beiden (Bernstein, 2006; Potratz, 2012).

Im Vordergrund der klinischen Symptomatik stehen Schmerzen, welche intermittierend und in ihrer Intensität sehr variabel auftreten können und häufig auch nachts



nicht vollständig verschwinden. In der Regel sind sie anamnestisch nicht auf ein adäquates Trauma zurückzuführen. Häufig werden die Beschwerden zunächst als Wachstumsschmerz oder körperliche Überanstrengung fehldiagnostiziert. Nicht zuletzt auch, da es sich zumeist um junge, körperlich sehr aktive und im Wachstum befindliche Patienten handelt, sodass der Diagnosezeitpunkt heute etwa 4-6 Monate nach Beginn der Symptomatik liegt. Im Verlauf werden die Schmerzen von Schwellungen bis hin zu einer palpablen, extensiv-destruierend wachsenden Tumormasse begleitet. Etwa 10% der Patienten stellen sich mit einer pathologischen Fraktur als Initialsymptom vor. Systemische Symptome wie Fieber und Gewichtsverlust treten bei einem Drittel der Patienten auf und weisen häufig auf eine fortgeschrittene oder bereits metastasierte Erkrankung bei Diagnosestellung hin (Bernstein, 2006; Ewing, 1972; Potratz, 2012).

Diagnostisch kommt bei einer ossär vermuteten Läsion zunächst eine konventionelle Röntgenaufnahme in zwei Ebenen zum Einsatz. Klassischerweise zeigt sich bei einem ES eine permeativ-destruierende Osteolyse des Knochens mit zwiebelschalenartiger Abhebung des Periosts sowie weiteren, typisch malignen Periostreaktionen wie Spiculae und Codman-Dreiecke (Patnaik, 2018). Bei erschwerter radiologischer Detektion der Tumorlokalisierung (wie z.B. an Becken oder Wirbelsäule) kann eine <sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) notwendig werden. Eine Magnetresonanztomographie ermöglicht zur Abgrenzung von umliegendem Weichteilgewebe und zur Bestimmung der Größe der Tumormasse die genauere Darstellung der Primärtumorregion (Voss, 2018). Die Tumorgöße ist sowohl für die operative Planung als auch als Grundlage für die Prognose und Verlaufskontrollen unter einer Chemotherapie von entscheidender Bedeutung. Eine definitive Diagnose kann jedoch erst durch eine Biopsie und histopathologische Untersuchung gestellt werden. Um Artefakte in der Bildgebung zu vermeiden, muss eine Biopsie zwingend erst nach der notwendigen Bildgebung durchgeführt werden (Potratz, 2012).

Durch multimodale Therapieansätze unter anderem durch Einführung einer kombinierten Chemotherapie, kann mittlerweile die Überlebensrate von früher 10% unter operativer Therapie und Radiotherapie auf heute bis zu 70% angehoben werden (Biswas and Bakhshi, 2016; van Maldegem, 2012). Die Kombinations-Chemotherapie wird international in unterschiedlichen Ansätzen verwendet: in Europa wird vorwiegend das VIDE-Schema (Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und

Etoposid) (Juergens, 2006), in Nordamerika das VDC/IE-Schema (Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid) verwendet (Felgenhauer, 2013; Grier, 2003). Eine autologe Stammzelltransplantation kann eine Intensivierung der myelosuppressiven Chemotherapie ermöglichen und die Remissionsrate steigern (Laurence, 2005).

Histologisch sind ES-Zellen undifferenzierte, kleine, runde Zellen mit großem, rundem Nukleus und schmalem, wenig eosinophilen Plasmasaum. Die mitotische Aktivität der Zellen ist gering. ES-Zellen exprimieren in hohem Maße CD99 auf ihrer Oberfläche. Alle ES werden histopathologisch als G3, also als hochmaligne klassifiziert (Riggi, 2005; Suh, 2002). DNS-Mikroarray-Analysen konnten eine Beziehung zu neuroektodermalem und endothelialelem Gewebe zeigen (Staege, 2004). Einige Studien weisen darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen Vorläufer der ES-Proliferation sind (Lin, 2011; Ross, 2013; Tirode, 2007).

Charakteristisch für das ES ist eine spezifische Translokation im Bereich t(11;22)(q24;q12), welche das EWSR1-Gen (*Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1*, kurz EWS-Gen) auf Chromosom 22 und vor allem das FLI1-Gen (*Friend Leukemia Virus Integration 1*), einem Mitglied der ETS (*E-twenty-six-specific*)-Transkriptionsfaktoren, auf Chromosom 11 betrifft (Schwentner, 2015). Eine EWS-Gen-Translokation mit anderen Genen kann zu anderen Pathologien führen. So kann beispielsweise eine Translokation zwischen dem EWS- und ATF1-Gen (*Activating Transcription Factor 1*) zur Entwicklung eines Klarzellsarkom führen (Antonescu, 2002; Ordonez, 2009). Somit scheint eher das Partnergen als das EWS-Gen selbst für die Spezifität des Tumors verantwortlich zu sein (Ordonez, 2009).

Unter den ETS-Genen ist das FLI1-Gen mit 85% am häufigsten betroffen. Genprodukt dieser Fusion ist der chimere Transkriptionsfaktor EWS/FLI1, welcher aufgrund seiner Häufigkeit als Hauptkomponente der Malignität des ES angesehen wird (Arvand and Denny, 2001; Delattre, 1992; Downing, 1993). Hierbei besitzt das EWS-Gen eine RNS-Bindungsstelle, wohingegen FLI1 ein an DNS bindender Transkriptionsfaktor ist, welcher eine Vielzahl von Genen binden und somit auch eine Vielzahl von Funktionen – u.a. Differenzierung und Apoptose – induzieren kann (Delattre, 1992; Riggi and Stamenkovic, 2007). EWS/FLI1 führt zu einer Hochregulierung von Genen, die Proliferation und Wachstumsreize von Zellen induzieren. Hierzu gehören unter anderem: EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), GPR64 (*G-protein-coupled receptor 64*), STEAP1 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate*), IGF1 (*insulin like growth factor 1*) und HOX (*homeobox*) (Grunewald, 2012; Richter,

2013; Richter, 2009). Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnten mehr als 1000 spezifische Gene identifiziert werden. Der Großteil (ca. 80%) dieser Gene bewirkt allerdings eine Suppression, vornehmlich von Funktionen wie Zellarrest und Apoptoseinduktion und bildet so eine weitere wichtige Komponente der Tumorentstehung (Hahm, 1999; Prieur, 2004).

## **1.2. Adoptive T-Zelltherapie**

Trotz therapeutischer Fortschritte werden jedoch dringend neue Therapieansätze benötigt, insbesondere weil die Überlebensrate bei metastasiertem ES noch immer unter 30% liegt; bei Patienten mit Rezidiv sogar noch niedriger (Biswas and Bakhshi, 2016). Auch um Langzeitkomplikationen einer Chemo-, Radio- oder operativen Therapie zu minimieren und dem Patienten während und nach der Therapie eine möglichst hohe Lebensqualität zu gewährleisten, ist die Notwendigkeit groß die Erkenntnisse aus experimenteller, zyto- und molekulargenetischer Forschung in eine adäquate Therapie umzusetzen, dessen Angriffspunkt die pathogenetische Veränderung der Tumorzelle selbst darstellt. Die im klinischen Alltag etablierten Therapieansätze wirken von außen auf die Tumorzelle ein und stellen künstlich generierte Verfahren dar, um den Tumorprogress zu stoppen, lokal zu eliminieren und seine systemische Ausbreitung einzudämmen oder sogar zu verhindern.

Warum aber anstatt eines exogenen Verfahrens nicht das modifizieren, was für so viele andere Krankheiten der Körper alleine schafft? Die Immunonkologie hat in den letzten Jahren mehrere vielversprechende Therapieansätze hervorgebracht, die eine Induktion des Immunsystems zur Bekämpfung des Tumors vorsehen. T-Lymphozyten sind hier in den Mittelpunkt der Forschung mit verschiedenen Ansätzen gerückt. T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche sogenannte Checkpoint-Moleküle, die eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Aktivierung oder Apoptoseinduktion spielen. Sie dienen der Erhaltung peripherer Toleranz und der Kontrolle destrukturierender Immunantworten (Haanen and Robert, 2015). Dies ist vor allem im Kontext von chronischen Erkrankungen und akuten Entzündungsprozessen von Bedeutung, um periphere Toleranz zu erhalten und Autoimmunprozessen vorzubeugen. Tumorzellen haben die Fähigkeit sich diesen Kontrollmechanismus der T-Zellen zunutze zu machen, um diese zu inaktivieren. Immuncheckpoint-Inhibitoren wie CTLA4- oder

PD1-blockierende Antikörper blockieren diese inhibitorischen Rezeptoren und reaktivieren somit T-Zellen (Dong, 2002; Wherry and Kurachi, 2015). In klinischer Anwendung sind Checkpoint-Inhibitoren mittlerweile bei Behandlung verschiedener Lymphome, bei Tumorrezidiven oder refraktären Erkrankungsverläufen von Tumoren (Hodi, 2010; Keir, 2008; Robert, 2011). Unterschiedliche Studien deuten auf eine vielversprechende Therapieoption durch Checkpoint-Inhibitoren hin. So ist eine Monotherapie mit Pembrolizumab bei therapienaiven Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) im Stadium IV und >50% PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*) Expression die Erstlinientherapie. Sie ist nicht nur hinsichtlich der Nebenwirkungen sondern auch hinsichtlich des therapeutischen Erfolges einer Chemotherapie in diesem Stadium signifikant überlegen (Reck, 2016). Da durch die Therapie aber nicht nur Tumorantigen-spezifische T-Zellen reaktiviert werden, kann es zu einer generalisierten T-Zellinduktion und so zu zum Teil schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen wie Hautreaktionen (Vitiligo, Juckreiz), gastrointestinalen Symptomen (Diarrhoe, Kolitis) oder endokrinen Dysfunktionen (Hypophysitis, Thyroiditis, adrenale Insuffizienz), sowie auch Hepatitiden kommen (Barbee, 2015; Hude, 2017; Intlekofer and Thompson, 2013).

Einen weiteren Therapieansatz auf immunmodulatorischer Ebene beschreibt die adoptive zelluläre Therapie (ACT). Bei der ACT werden drei Ansätze unterschieden, die allesamt das gemeinsame Ziel verfolgen, Tumorerkrankungen mit Hilfe von tumorspezifischen Lymphozyten zu bekämpfen, entweder im allogenen oder autologen System.

Bei der Antitumorthherapie mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) wird eine bestehende Immunantwort des Körpers gegen den Tumor verstärkt. Lymphozyten werden hierfür direkt aus dem Tumorgewebe entnommen, expandiert und dem Patienten wieder zugeführt. Vorteilhaft ist, dass Tumorantigene nicht identifiziert werden müssen und durch die bereits bestehende Immunantwort auf verschiedene Tumorantigene eine polyklonale Kultur aus CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>- T-Zellen infundiert wird, welche dem Tumor eine geringere Chance bietet mittels Antigen-Fluchtvarianten den T-Zellen zu entkommen. Jedoch werden viele dieser Tumorantigene auch in normalem, gesundem Gewebe exprimiert, sodass die Affinität der T-Zellrezeptoren durch Selbsttoleranzmechanismen zur Verhinderung von autoimmunen Prozessen vergleichsweise gering ist. Eine Induktionstherapie mit Chemotherapeutika wie z.B.

Cyclophosphamid oder Fludarabin zur Lymphodepletion, sowie eine T-Zell-Stimulation mit Interleukin-2 verbessern die Antitumortherapie mit TIL, sodass eine Ansprechrate von 56% (in Studien zum multiplen Melanom) erreicht werden konnte (Rosenberg, 1988; Svane and Verdegaal, 2014).

Zwei weitere Ansätze der ACT bilden die ACT mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) und die ACT mit T-Zellrezeptor-(TZR)-modifizierten T-Zellen. Sie bedienen sich einer Entdeckung die Dembic und Kollegen schon 1986 gemacht haben (Dembic, 1986). Sie haben herausgefunden, dass die Spezifität einer T-Zelle verändert werden kann, indem neue TZR-Gene in die Zelle transferiert werden. Ein Ansatz, der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation vor Infektionen (wie zum Beispiel dem Cytomegalie-Virus) schützen sollte, konnte 1992 von Riddell und Kollegen erfolgreich umgesetzt werden (Riddell, 1992). In ihrer Forschungsarbeit konnten sie zeigen, dass die Cytomegalie-Virus spezifischen T-Zellen zu einer Immunantwort gegen das Cytomegalie-Virus führten und dauerhaft persistierten, jedoch ohne Toxizität zu induzieren. Diese Idee sollte nun von der Virustherapie zur Krebstherapie übertragen werden.

Die adoptive T-Zelltherapie mit CARs nutzt autologe T-Zellen, welche nach Apherese mit einem CAR-exprimierenden, retro- oder lentiviralen Vektor transduziert werden. Der CAR-T-Zellrezeptor ist aus einer variablen, extrazellulären Domäne aufgebaut, welche meist aus Antikörpern besteht, an der das Antigen bindet. Diese ist über ein Bindeglied („Spacer“) mit einer transmembranären Domäne verbunden. Die erste CAR-Generation war ausschließlich mit einer CD3 $\zeta$  Signaldomäne zur Aktivierung der T-Zelle ausgestattet. *In vivo* Versuche zeigten jedoch, dass hierdurch die Zellen nicht ausreichend aktiviert werden konnten. Die neuesten Generationen von CAR-T-Zellen verfügen über zwei oder mehrere kostimulatorische Signale (CD27, CD28, CD137, ICOS, OX40). Diese wurden in der Weiterentwicklung der CAR-Therapie zugefügt und verbessern sowohl die Aktivierung der T-Zelle und den Anti-Tumoreffekt als auch die Persistenz der Zellen *in vivo* (Maus, 2014; Milone, 2009). Bisher gibt es sehr erfolgreiche Therapien mit autologen CAR-T-Zellen vor allem bei lymphatischen Erkrankungen wie z.B. akuter lymphatischer Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen und multiplem Myelom mit Ansprechraten von 90% (Maude, 2014; Porter, 2015). CAR-T-Zellen bieten entscheidende Vorteile, indem sie keiner massiven Expansion bedürfen und unabhängig vom HLA-Status (Humanes Leukozyten Antigen) sind. Sie können unprozessierte Antigene erkennen, welche nicht von der Zelle über MHC

(*major histocompatibility complex*) präsentiert werden müssen. Außerdem ist durch die Transduktion eines CAR-Rezeptors keine Selbsttoleranz zu erwarten (Han, 2018). Die CAR-Therapie scheint mit ihren zum Teil hohen Ansprechraten eine gute Therapieoption zu werden, jedoch verbleiben auch bei diesem Therapieansatz Nebenwirkungen mit zum Teil schwerwiegende Komplikationen: So kann es zu einem Zytokin-Freisetzungssyndrom (*cytokine release syndrome*) kommen, bei dem es durch eine starke Aktivierung des Immunsystems durch die CARs zu einer massiven Zytokinausschüttung kommt (Giavridis, 2018). Dies führt unter anderem zu Übelkeit, Fieber, Hypotension und Hypoxie (Tang, 2016). Mittlerweile ist ein Zytokin-Freisetzungssyndrom jedoch mit Hilfe von einer Antikörpertherapie behandelbar (Cho and Perales, 2016). Auch ein Tumorlyse-Syndrom kann durch die schnelle Zerstörung des Tumorgewebes zu klinischen Symptomen wie hohem Fieber, kardialer Dysfunktion, akuter Atemnot, Nieren- und Leberversagen, Neurotoxizität sowie disseminierten intravasalen Koagulopathie führen (Maude, 2018; Maus, 2014; Morgan, 2006). Da CAR-Rezeptoren Antigene unabhängig von MHC-Molekülen erkennen, handelt es sich bei diesen ausschließlich um Oberflächenantigene (Eshhar, 2001). Dies grenzt die Auswahl geeigneter Antigene stark ein. Da diese Antigene meist auch Selbstantigene sind, ist die Sicherheit dieser Therapie fraglich, da so auch potentiell Normalgewebe durch die CAR-Zellen angegriffen werden kann (Cieri, 2014). Regulatorische T-Zellen könnten diese Komplikationen in Zukunft möglicherweise minimieren. Diese speziellen T-Zellen haben die Aufgabe eine Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und so die Selbsttoleranz zu erhalten. Ohne vorherige Induktionstherapie führen sie bei einer CAR-Therapie zu einer Inhibierung der Wirksamkeit der CARs. Diesen Umstand kann man sich in Zukunft zunutze machen, um eine überschießende Reaktion der CARs einzudämmen. Darüber hinaus gibt es mittlerweile sogar Ansätze, spezifische regulatorische T-Zellen mit CAR-Rezeptoren zu generieren, um Autoimmunerkrankungen adäquat zu behandeln (Boardman, 2016).

Die ACT mittels TZR-modifizierten T-Zellen nutzt Spender-T-Zellen, in die Antigen-spezifische Rezeptoren eingebracht werden. Diese T-Zellen erkennen MHC-abhängig und hochspezifisch ihr Antigen und lösen so das Problem der CAR-T-Zellen, welche nur Oberflächenantigene erkennen. Jedoch würden physiologischerweise T-Zellen mit zu hoher Affinität im Thymus aussortiert werden (Cole, 2014). Die meisten Tumorantigene sind hochexprimierte Selbstantigene, die auch im Normalge-

webe zu finden sind (de Aquino, 2015). So werden spezifische T-Zellen gegen diese Selbstantigene im Thymus eliminiert, welches einen physiologischen Mechanismus des Körpers beschreibt, um autoimmune Prozesse zu vermeiden (de Aquino, 2015). Da bei gut ausgewähltem Antigen und hochspezifischen T-Zellen das Risiko einer autoimmunen Reaktion aber kalkulierbar scheint, wird nach Ansätzen gesucht diesen Prozess zu umgehen. Eine Lösung konnte in der Nutzung von alloreaktiven T-Zellrezeptoren gefunden werden (Brzostek and Gascoigne, 2017; Felix and Allen, 2007). Die Alloreaktivität beschreibt, dass die T-Zellen spezifische Peptide auch in Kombination mit fremdem MHC erkennen. Einer Eliminierung im Thymus können sie so aber entgehen. Spender-T-Zellen erkennen auf diese Weise trotz fremdem MHC der Patientenzellen ihr Antigen und können so als hochaffine Spender-T-Zellen im Patienten wirken. Die Methode Spender-T-Zellen einzusetzen, ermöglicht auch eine höhere Bindungsaffinität als es bei Selbst-MHC und autologen T-Zellen möglich wäre (Felix and Allen, 2007). Dies ist jedoch ein schmaler Grad, denn eine hohe Affinität kann im Falle eine Kreuzreaktivität gegen lebenswichtige Organe zu schwerwiegenden Komplikationen führen (Linette, 2013).

In der Tumorthherapie hat die allogene T-Zelltherapie mit T-Zellrezeptor-modifizierten T-Zellen in den letzten Jahren zunehmend das Interesse der Wissenschaftler und Kliniker geweckt. Erste Erfolge der Verwendung von Spender-T-Zellen wurden mit retroviralem Transfer eines Melanom-spezifischen T-Zellrezeptor 1999 von der Arbeitsgruppe Clay et al. erzielt (Clay, 1999). Die vielversprechendsten Erfolge dieser Therapie sind bislang bei Patienten bei NY-ESO-1 exprimierendem Synovialzellsarkom und beim Melanom beobachtet worden. 4 von 6 der Patienten mit Synovialzellsarkom und 5 von 11 der Patienten mit Melanom sprachen auf die Therapie an. Bei 2 von 11 Patienten konnte eine komplette Remission über 1 Jahr beobachtet werden (Robbins, 2011).

Um eine T-Zelltherapie mit TZR noch effizienter zu gestalten, gibt es verschiedene Möglichkeiten die Affinität und Avidität der modifizierten T-Zelle zu verstärken. Unter Affinität versteht man hierbei die Stärke der monomeren Bindung des T-Zellrezeptors zu seinem Antigen. Die Avidität beschreibt wiederum die Summe der Affinitäten sowie das Expressionslevel des eingebrachten TZR (Uttenthal, 2012). Eine Möglichkeit die Expression des TZR zu verbessern, ist die Codonoptimierung von T-Zellrezeptorsequenzen (Scholten, 2006). Unter Beibehaltung der natürlichen Aminosäureabfolge werden hier wenig genutzte Codons durch Codons ersetzt, die

beim Menschen häufiger vorkommen. Dies erhöht die Expression des TZR in den T-Zellen. Weiterhin ist es entscheidend, das Risiko einer Fehlpaarung zwischen exogen eingebrachten TZR- und ursprünglich vorkommenden TZR-Ketten zu verringern, da hiervon ebenfalls die Expressionsstärke des TZR abhängt. Weiterhin kann eine Fehlpaarung auch eine mögliche Ursache für Reaktivität gegen normales, gesundes Gewebe sein – im Sinne einer so genannten *off-target*-Reaktivität (Bendle, 2010). Eine Sequenzmodifikation beider Ketten stabilisiert so die korrekte Paarung der Ketten, die Dimerisierung des eingebrachten TZR und erhöht somit auch die Expressionsstärke des TZR. Hierzu gehört neben der Codonoptimierung auch die Minimalmurinisierung. Dafür werden in den konstanten Bereichen der TZR-Ketten humane Aminosäuren gegen murine Aminosäuren ausgetauscht und so eine bessere Expression und eine stärkere Dimerisierung der TZR erreicht (Sommermeyer and Uckert, 2010).

### **1.3. Homöobox-Gen D11**

Neben der Optimierung des T-Zellrezeptors ist jedoch vor allem auch die richtige Auswahl eines geeigneten Antigens Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie mit T-Zellrezeptor-modifizierten T-Zellen. Hierfür zeigten posteriore HOX-Gene großes Potential (Svoboda, 2014; von Heyking, 2016).

HOX-Gene sind eine Familie von regulativen Genen, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und der richtigen Entwicklung des Körpers spielen. Die Genprodukte der HOX-Gene sind Transkriptionsfaktoren (Gehring, 1985; Svingen and Tonissen, 2006; von Heyking, 2016). Klasse 1 HOX-Gene sind in vier Bereichen auf verschiedenen Chromosomen aufgeteilt und werden als HOX A-D bezeichnet (Apiou, 1996; Cillo, 1994). Ein gemeinsames Muster der HOX-Gene ist eine hochkonservierte Folge von 64 Aminosäuren, welche für die DNS-Bindung verantwortlich ist, darüber die Regulation bestimmter Genprodukte bewirkt und als Homöodomäne bezeichnet wird (Svingen and Tonissen, 2006). HOX-Gene spielen jedoch nicht nur eine wichtige Rolle in sich entwickelnden, sondern auch in adulten, ausgereiften Organen. Sie übernehmen hier Funktionen wie Zellwachstum und Differenzierung, Zell-Zell-Kommunikation und Kontrolle der Zellproliferation (Cillo, 2001; Magli, 1991). Posteriore HOX-Gene, wie HOXD11, HOXD12 und HOXD13



spielen eine direkte Rolle bei der Ossifikation und Formierung der Knochen (von Heyking, 2016). In Mikroarray-Analysen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass posteriore HOXD-Gene im ES signifikant hochreguliert sind und zum malignen Phänotyp beitragen (von Heyking, 2016). Analysen über die Expression in Normalgewebe ergeben, dass HOXD11 in geringem Maße auch in Normalgewebe, so beispielsweise den Speicheldrüsen exprimiert wird (von Heyking, 2016). HOXD11<sup>50</sup> ist ein Peptid aus 9 Aminosäuren, das als Antigen zur adoptiven T-Zelltherapie beim ES für die vorliegende Arbeit ausgewählt werden konnte.

#### 1.4. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es allo-restringierte, peptidspezifische T-Lymphozyten, die gegen das für das ES pathognomische Antigen HOXD11<sup>50</sup> gerichtet sind, zu generieren. Selektierte HOXD11<sup>50</sup> spezifische Spender-T-Zellen sollen zunächst in ELISpot-Assays hinsichtlich ihrer Reaktivität gegen verschiedene Tumorzellen überprüft werden. Gemessen wird hier die Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) Ausschüttung der T-Zellen im Kontakt mit HOXD11<sup>50</sup> exprimierenden Tumorzellen zur Charakterisierung der Peptidspezifität, sowie mit Tumorzellen ohne HOXD11<sup>50</sup> Expression. Weiterhin soll mit HOXD11<sup>50</sup> exprimierenden, HLA-A\*02:01-positiven und -negativen Zellen die Alloreaktivität der Zellen nachgewiesen werden. Die Peptidspezifität soll in Blocking-Experimenten mit Wildtyp-ES-Zellen und ES-Zellen mit HOXD11-*knock-down* untersucht. In einem *xCELLigence Assay* soll mittels elektrischer Impedanzmessung die Bekämpfung von Tumorzellen durch den T-Zellklon im zeitlichen Verlauf gezeigt werden.

In einem zweiten Schritt wird dann die Identifizierung der TZR-Sequenz mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) begonnen. Mit Hilfe von verschiedenen Primern wird die variable TZR-Sequenz auf cDNS Ebene identifiziert und mittels *in silico* Analyse zur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors zusammengefügt werden. Nach Identifizierung der Gesamtsequenz des TZR wird durch die Firma GeneArt ein T-Zellrezeptorkonstrukt erstellt. Zwei Versionen dieses Konstruktes werden generiert, eine Wildtyp-Version in exakter Sequenz des ermittelten Rezeptors und eine codonoptimierte und minimalmurinisierte Version.

Die Einbringung des Rezeptors soll dann in T-Zellen mit Stammzeleigenschaften erfolgen. Zellen in diesem Stadium bieten entscheidende Vorteile hinsichtlich ihres Regenerationspotentials und ihrer Lebensdauer gegenüber T-Zellen im Gedächtnis- oder Effektorstadium.

## 2. Material

### 2.1. Herstellerliste

| <u>Hersteller</u>          | <u>Firmensitz</u>               |
|----------------------------|---------------------------------|
| Abcam                      | Cambridge, UK                   |
| Abott                      | Wiesbaden, Deutschland          |
| ACEA                       | San Diego, Kalifornien, USA     |
| Ambion                     | Texas, USA                      |
| Applied Biosystems         | Darmstadt, Deutschland          |
| Autoimmun Diagnostika      | Strassberg, Deutschland         |
| B. Braun Biotech Int.      | Melsungen, Deutschland          |
| BD Bioscience Europe       | Heidelberg, Deutschland         |
| Beckman Coulter            | Palo Alto, Kalifornien, USA     |
| Beckton Dickinson          | Heidelberg, Deutschland         |
| Berthold detection systems | Pforzheim, Deutschland          |
| Biochrom                   | Berlin, Deutschland             |
| BioRad                     | Richmond, Kalifornien, USA      |
| Biozym                     | Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Elma                       | Singen, Deutschland             |
| Eppendorf                  | Hamburg, Deutschland            |
| Falcon                     | Oxnard, Kalifornien, USA        |
| GE Healthcare              | Little Chalfont, UK             |
| GeneArt                    | Regensburg, Deutschland         |
| Genomed                    | St. Luis, Missouri, USA         |
| Genescript                 | New Jersey, USA                 |
| GFL GmbH                   | Segnitz, Deutschland            |
| GLW                        | Würzburg, Deutschland           |
| Greiner Bio-One GmbH       | Frickenhausen, Deutschland      |
| Heraeus                    | Hanau, Deutschland              |
| Immuno Tools               | Friesoythe, Deutschland         |
| Implen GmbH                | München, Deutschland            |

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Leica                    | Wetzlar, Deutschland           |
| LGC Standards GmbH       | Wesel, Deutschland             |
| Life Technologies        | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Lonza                    | Basel, Schweiz                 |
| Mabtech                  | Hamburg, Deutschland           |
| Machery & Nagel          | Düren, Deutschland             |
| Merck Millipore          | Darmstadt, Deutschland         |
| Metabion                 | Planegg, Deutschland           |
| Miltenyi                 | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Mirus                    | Madison, Wisconsin, USA        |
| Molecular BioProducts    | San Diego, Kalifornien, USA    |
| Nalgene                  | New York, USA                  |
| PAA                      | Cölbe, Deutschland             |
| Peptotech                | New Jersey, USA                |
| R&D Systems              | Minneapolis, Minnesota, USA    |
| Roche                    | Penzberg, Deutschland          |
| Roth                     | Karlsruhe, Deutschland         |
| Sarstedt                 | Nürnbrecht, Deutschland        |
| Sartorius                | Göttingen, Deutschland         |
| Scientific Industries    | New York, USA                  |
| Scotsman                 | Mailand, Italien               |
| Sequiserve               | Vaterstetten, Deutschland      |
| Sempermed                | Wien, Österreich               |
| Sigma Aldrich            | St. Louis, Missouri, USA       |
| Stratagene               | Ceder Creek, Texas, USA        |
| Syngene                  | Cambridge, England             |
| Systec                   | Wettenberg, Deutschland        |
| TaKaRa Bio Europe        | Paris, Frankreich              |
| Taylor-Wharton           | Husum, Deutschland             |
| Thermo Fisher Scientific | Ulm, Deutschland               |

|                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| Thermo Scientific | Braunschweig, Deutschland |
| TKA GmbH          | Niederelbert, Deutschland |
| VWR               | Darmstadt, Deutschland    |

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

| <u>Material</u>   | <u>Hersteller</u>          |
|---|----------------------------|
| 6 Loch Zellkulturplatte                                     | Falcon                     |
| 24 Loch Zellkulturplatte                                    | Falcon                     |
| 96 Loch Zellkulturplatte (flach/rund)                       | TPP                        |
| 96 Loch Zellkulturplatte (v Boden)                          | Greiner Bio-One            |
| Zellkulturflaschen (25, 75 und 175cm <sup>2</sup> )         | Greiner Bio-One            |
| Zellsiebe 40 µm   | Falcon                     |
| Zellseparation Säule (MACS,LS,MS)                           | Miltenyi                   |
| Kryokonservierungsgefäß 1,5 ml                              | Sarstedt                   |
| Küvetten  | Roth                       |
| 96 Loch E-Platten   | ACEA                       |
| Filter 0,45 µm  | Sartorius                  |
| Handschuhe (Nitril, Latex)                                  | Sempermed                  |
| MultiScreen-HA Filterplatte                                 | Merck Millipore            |
| Parafilm  | Pechiney Plastic Packaging |
| Pipetten (25, 10, 5 ml)                                     | VWR                        |
| Pipettenspitzen mit Filter (1000, 200, 100, 10 µl)          | Thermo Scientific          |
| Reagenzien Reservoir (50 ml)                                | Falcon                     |
| Reagenzien Reservoir mit Unterteiler                        | VWR                        |
| Zentrifugenröhrchen (Polypropylen, 15ml)                    | Falcon                     |
| Reagenzröhrchen für FACS (5 ml)                             | Sarstedt                   |
| Reagenzröhrchen für PCR                                     | Sarstedt                   |
| Reagenzröhrchen mit Sicherheitsverschluss (1,5 ml und 2 ml) | Roth                       |

### 2.3. Geräte

| <u>Gerät</u>               | <u>Name</u>                                    | <u>Hersteller</u>          |
|----------------------------|--|----------------------------|
| Autoklav                   | V95  | Systec                     |
| Schüttler                  | Certomat BS-T                                  | Sartorius                  |
| Eismaschine                | AF 100   | Scotsman                   |
| Zählkammer                 | Neubauer                                       | Brand                      |
| Zentrifuge                 | Multifuge 3 S-R                                | Heraeus                    |
| Zentrifuge                 | Biofuge fresco                                 | Heraeus                    |
| Kryo-Einfriergeräte        | Mr. frosty                                     | Nalgene                    |
| Elektroporator             | Nucleofactor I                                 | Amaxa biosystems           |
| Elektrophoresekammer       |  | BioRad                     |
| ELISpot Reader             | AID-ELIRIFL04                                  | Autoimmun Diagnostika      |
| Durchflusszytometer        | FACScalibur™                                   | Becton Dickinson           |
| Gefrierschrank (-80°C)     | Hera freeze                                    | Heraeus                    |
| Gefrierschrank (-20°C)     | Cool vario                                     | Siemens                    |
| Kühlschrank (+4°C)         | Cool vario                                     | Siemens                    |
| Geldokumentation           | Gene Genius                                    | Syngene                    |
| Thermomixer                | Thermomixer comfort                            | Eppendorf                  |
| Inkubator                  | Hera cell 150                                  | Heraeus                    |
| Stickstofftank             | L-240 K series                                 | Taylor-Wharton             |
| Luminometer                | Sirius Luminometer                             | Berthold detection systems |
| Mehrkanalpipette           | (10-100 µl)                                    | Eppendorf                  |
| Mikropipetten              | (0.5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) | Eppendorf                  |
| Mikroskop                  | DMIL   | Leica                      |
| Nanophotometer             |  | Implen                     |
| PCR cycler                 |  | Eppendorf                  |
| Pipettierhilfe             | Stripettor Plus                                | Falcon                     |
| Rotator                    |  | GLW                        |
| Sterilbank                 |  | Heraeus                    |
| Ultraschallreinigungsgerät | S60H Elmasonic                                 | Elma                       |
| Wasserbad                  |  | GFL GmbH                   |

|                    |                |                       |
|--------------------|----------------|-----------------------|
| Vortexer           | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries |
| Reinstwassersystem | TKA GenPure    | TKA GmbH              |

#### 2.4. Chemikalien und Reagenzien

| <u>Chemikalien/Reagenzien</u>               | <u>Hersteller</u>                 |
|---|-----------------------------------|
| Agar  | Sigma                             |
| Agarose                                     | Invitrogen                        |
| AIM-V Medium                                | Invitrogen                        |
| Ampicilin                                   | Merck                             |
| BCP (1-bromo-3-chloropropane)               | Sigma                             |
| Gelbeladungspuffer (Blue Juice)             | Invitrogen                        |
| Dimethylformamid (DMF)                      | Roth                              |
| Desoxynukleotide (dNTPs)                    | Roche                             |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                     | Merck                             |
| DMEM Medium                                 | Invitrogen                        |
| Erythrozyten Lysepuffer                     | Apotheke, Klinikum recht der Isar |
| Ethidiumbromid (EtBr)                       | BioRad                            |
| Ethanol                                     | Merck                             |
| Fetales Kälberserum (FKS)                   | Biochrom                          |
| Ficoll Separationsmedium                    | GE Healthcare                     |
| Formaldehyd (37%)                           | Merck                             |
| Glycerol                                    | Merck                             |
| HBSS (Hank's buffered salt solution)        | Invitrogen                        |
| Salzsäure (HCL)                             | Merck                             |
| HEPES                                       | Sigma                             |
| Humanes AB Serum                            | Lonza                             |
| Isopropanol                                 | Sigma                             |
| MACS <sup>®</sup> BSA Stammlösung           | Miltenyi                          |
| autoMACS <sup>™</sup> Waschpuffer           | Miltenyi                          |
| Natriumpyruvat                              | Invitrogen                        |
| Nicht-essentielle Aminosäuren ( 100x, NEAS) | Invitrogen                        |

|   |            |
|---|------------|
| Phosphate Buffered Saline (PBS)                                     | Invitrogen |
| PCR Puffer (10x)  | Invitrogen |
| Pepton  | Invitrogen |
| 1kb plus DNS Leiter   | Invitrogen |
| rhINF- $\gamma$ (rekombinantes humanes Interferon- $\gamma$ )       | R&D        |
| rhIL7 (rekombinantes humanes IL7)                                   | R&D        |
| Retronectin   | TaKaRa     |
| RPMI 1649 Medium  | Invitrogen |
| rhTNF $\alpha$ (rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor $\alpha$ ) | R&D        |
| TransIT <sup>®</sup> -293   | Mirus      |
| Trypan blau   | Sigma      |
| Trypsin/EDTA  | Invitrogen |
| Tween 20  | Sigma      |

## 2.5. Kits

| <u>Kits</u>                                     | <u>Hersteller</u>  |
|---|--------------------|
| AccuPrime Taq DNA Polymerase System             | Invitrogen         |
| CD8 <sup>+</sup> T-Zell Isolationskit, human    | Miltenyi           |
| Cell Line Nucleofector <sup>®</sup> Kit R       | Lonza              |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit    | Applied Biosystems |
| JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit                | Genomed            |
| MycoAlert <sup>™</sup> Mycoplasma Detection Kit | Miltenyi           |
| NucleoSpin <sup>®</sup> Plamis Kit              | Macherey-Nagel     |
| StrataPrep <sup>®</sup> DNA Gel Extraction Kit  | Stratagene         |
| TRI Reagent RNA Isolation Kit                   | Ambion             |



## 2.6. Antikörper

| <u>Name</u>                 |                      | <u>Hersteller</u> |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|
| Anti-human GranzymeB mAB    | GB10, aufgereinigt   | Mabtech           |
| Anti-human GranzymeB mAB    | GB11, biotinyliert   | Mabtech           |
| Anti-human IFN $\gamma$ mAB | 1-D1K, aufgereinigt  | Mabtech           |
| Anti-human IFN $\gamma$ mAB | 7-B6-1, biotinyliert | Mabtech           |

| <u>Name</u>               | <u>Konjugation</u> | <u>Klone</u> | <u>Hersteller</u> |
|---------------------------|--------------------|--------------|-------------------|
| Anti-humanes CD3          | PE                 | MOPC-21      | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD8          | APC                | RPA-T8       | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD8          | PE                 | RPA-T8       | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD45         | APC                | HI30         | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD45RO       | PE                 | UCHL1        | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD45RA       | PE                 | T6D11        | Miltenyi          |
| Anti-humanes CD95         | APC                | DX2          | BD Biosciences    |
| Anti-humanes CD197 (CCR7) | PE                 | 150503       | BD Biosciences    |
| Anti-humanes HLA A2       | FITC               | BB7.2        | BD Biosciences    |

Zur Blockade von MHC-I auf Tumorzellen wurde der säurefreie Anti-humane MHC-I Antikörper (W6.32) von Abcam genutzt.

## 2.7. Medien, Puffer und Lösungen

| <u>Name</u>                      | <u>Bestandteile</u>  |
|----------------------------------|--|
| Standardmedium für Tumorzellen   | 500 ml RPMI 1640 oder DMEM Medium, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin                     |
| T-Zellmedium (TZM)               | 500 ml AIM-V Medium, 5% hAB Serum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin                              |
| 293T Medium                      | 500 ml DMEM Medium, 10% FKS, 1mM Natriumpyruvat, 1mM NEAAs, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin     |
| LCL Medium                       | 500ml RPMI 1640 Medium, 10% FKS, 1mM Natriumpyruvat, 1mM NEAAs, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin |
| 4% Formaldehyd                   | 4% Formalin, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O        |
| 4% Paraformaldehyd               | 4% PFA in PBS, pH 7,4  |
| LB Medium                        | 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, in 1000 ml destilliertem Wasser                                       |
| LB Agar Medium                   | LB Medium, 2% Select Agar  |
| Färbepuffer Durchflusszytometrie | 0.5% BSA in PBS  |
| Einfriermedium für Tumorzellen   | FKS, 10% DMSO  |
| Einfriermedium für humane Zellen | hAB Serum, 10% DMSO  |
| 1x TAE Laufpuffer                | 50x TAE: 2 M Tris, 10% EDTA (0,5 M), 5,71% HCl   |
| Agarosegel                       | 200 ml TAE Puffer (1x), 0.7-3% Agarose, 3 µl EtBr  |

## 2.8. Primer

| <u>Name</u> | <u>Sequenz (5'-3')</u>                        |
|-------------|---|
| P-5'aST     | 5'-CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT-3'              |
| P-3'aST     | 5'-CTT GCC TCT GCC GTG AAT GT-3'              |
| 3'T-Ca      | 5'-GGT GAA TAG GCA GAC AGA CTT GTC ACT GGA-3' |
| PanVa1      | 5'-AGA GCC CAG TCT GTG ASC CAG-3'             |
| PanVa1.1    | 5'-AGA GCC CAG TCR GTG ACC CAG-3'             |
| Va2         | 5'-GTT TGG AGC CAA CRG AAG GAG-3'             |
| Va3         | 5'-GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA-3'             |
| Va4         | 5'-TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC-3'              |
| Va5         | 5'-GGC CCT GAA CAT TCA GGA-3'                 |
| Va6neu      | 5'-GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A-3'           |
| Va7         | 5'-ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG-3'             |
| Va8         | 5'-TGT GGC TGC AGG TGG ACT-3'                 |
| Va9         | 5'-ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA-3'             |
| Va10        | 5'-ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT-3'         |
| Va11        | 5'-AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT-3'             |
| Va12        | 5'-CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT-3'         |
| Va13        | 5'-GAG CCA ATT CCA CGC TGC G-3'               |
| Va14.1      | 5'-CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC-3'              |
| Va14        | 5'-CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC-3'              |
| Va15        | 5'-GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC-3'             |
| Va16        | 5'-TCA CGC GAA GAT CAG GTC AAC-3'             |
| Va17        | 5'-GCT TAT GAG AAC ACT GCG T-3'               |
| Va18        | 5'-GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT-3'              |
| Va19        | 5'-AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA-3'              |

|          |   |
|----------|---|
| Va20     | 5'-CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA-3'       |
| Va21     | 5'-GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT-3'       |
| Va22     | 5'-TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC-3'   |
| Va23     | 5'-TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC-3'       |
| Va24neu  | 5'-GAA CTG CAC TCT TCA ATG C-3'         |
| Va25     | 5'-ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA-3'   |
| Va26     | 5'-AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA-3'    |
| Va27     | 5'-ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG-3'        |
| Va28     | 5'-CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT-3'       |
| Va29     | 5'-AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA-3'        |
| Va30     | 5'-GAG GGA GAG AGT AGC AGT-3'           |
| Va31neu  | 5'-TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A-3'     |
| Va32     | 5'-CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA-3'        |
| P-5'bST  | 5'-AAG CAG AGA TCT CCC ACA C-3'         |
| P-3'bST  | 5'-GAG GTA AAG CCA CAG TTG CT-3'        |
| P-3CbII  | 5'-GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TC-3'    |
| Vb1      | 5'-GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG GCA C-3' |
| Vb2      | 5'-TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT-3'   |
| Vb3      | 5'-GTC TCT AGA GAG AAG AAG GAG GCG-3'   |
| Vb4      | 5'-ACA TAT GAG AGT GGA TTT GTC ATT-3'   |
| Vb5.1    | 5'-ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG AAA C-3' |
| Vb5.2    | 5'-TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG-3'   |
| Vb5.2T   | 5'-TTC CCT AAT TAT AGC TCT GAG CTG-3'   |
| Vb6.1neu | 5'-GCC CAG AGT TTC TGA CTT ACT TC-3'    |
| Vb6.2    | 5'-ACT CTG ASG ATC CAG CGC ACA-3'       |
| Vb6.3    | 5'-ACT CTG AAG ATC CAG CGC ACA-3'       |

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| Vb7     | 5'-CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C-3'   |
| Vb8     | 5'-ATT TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG-3' |
| Vb8S3   | 5'-GCT TAC TTC CGC AAC CGG GCT CCT-3' |
| Vb9neu  | 5'-CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT-3'     |
| Vb10    | 5'-CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT-3' |
| Vb11    | 5'-TCA ACA GCT TCC AGA ATA AGG ACG-3' |
| Vb12    | 5'-AAA GGA GAA GTC TCA GAT-3'         |
| Vb12S3  | 5'-GCA GCT GCT GAT ATT ACA GAT-3'     |
| Vb13neu | 5'-TCG ACA AGA CCC AGG CAT GG-3'      |
| Vb13.1  | 5'-CAA GGA GAA GTC CCC AAT-3'         |
| Vb13.2  | 5'-GGT GAG GGT ACA ACT GCC-3'         |
| Vb13S5  | 5'-ATA CTG CAG GTA CCA CTG GCA-3'     |
| Vb14    | 5'-GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT-3' |
| Vb15    | 5'-AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT-3' |
| Vb16    | 5'-AAA GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC-3' |
| Vb17    | 5'-CAG ATA GTA AAT GAC TTT CAG-3'     |
| Vb18    | 5'-GAT GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA-3' |
| Vb19    | 5'-AA TGC CCC AAG AAC GCA CCC TGC-3'  |
| Vb20    | 5'-AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC-3' |
| Vb21    | 5'-AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC-3'     |
| Vb22.1  | 5'-CAT CTC TAA TCA CTT ATA CT-3'      |
| Vb22.2  | 5'-AAG TGA TCT TGC GCT GTG TCC CCA-3' |
| Vb22.3  | 5'-CTC AGA GAA GTC TGA AAT AAT CG-3'  |
| Vb23    | 5'-GCA GGG TCC AGG TCA GGA CCC CCA-3' |
| Vb24neu | 5'-ATC CAG GAG GCC GAA CAC TTC T-3'   |

| <u>Name</u>                   | <u>Sequenz (5' – 3')</u>                                 |
|-------------------------------|--|
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Va1sN  | 5'-CAG GCG GCC GCC ACC ATG CTC CTG CTG CTC<br>GTC-3'     |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Va1asE | 5'-CCT GAA TTC TCA GCT GGA CCA CAG CCG-3'                |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> VbsN   | 5'-CAG GCG GCC GCA CCA TGG GAC AAG AAG TGA<br>CTC TGA-3' |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> VbasE  | 5'- CCT GAA TTC TAG CCT CTG GAA TCC TTT C-3'             |

## 2.9. Zelllinien

| <u>Name</u> | <u>HLA A2 Status</u> | <u>Beschreibung</u>  |
|-------------|----------------------|--|
| 293T        | Unbekannt            | Hochtransfektables Derivat der Zelllinie 293, transduziert mit SV40 (Simian Virus 40) T-Antigen. Ermöglicht die Produktion hoher Titer eines Retrovirus. |
| A673        | Positiv              | ES Zelllinie (Typ 1 Translokation) mit p53 Mutation, aus einem Primärtumor eines 15 jährigen Mädchens.   |
| Cos7        | Negativ              | Fibroblasten-Zelllinie aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze isoliert und stabil mit SV-40 transformiert.  |
| EW7         | Positiv              | ES-Zelllinie isoliert aus einem Schulterblatt-tumor; charakterisiert von O.Delattre (Institut Curie, Paris, France)                                      |
| K562        | Negativ              | Chronisch Myeloische Leukämie-Zelllinie gewonnen von einer 53-jährigen Patientin in einer Blastenkrise.  |
| LCL         | Positiv              | Lymphoblastoide Zelllinie; gewonnen bei einer Transformation von B-Zellen aus peripherem Blut von gesunden Spendern mit einem Mini-EBV Plasmid.          |
| MHH-ES1     | Negativ              | ES Zelllinie (Typ 2 Translokation), gewonnen aus Aszitesmaterial eines 12-jährigen, türki-   |

|            |         |  |
|------------|---------|--|
|            |         | schen Jungen mit Beckentumor und peritonealer Metastasierung.  |
| RD-ES      | Negativ | ES-Zelllinie (Typ 2 Translokation) 1984 gewonnen aus einem Primärtumor eines 19-jährigen kaukasischen Mann.                |
| SB-KMS-KS1 | Negativ | ES-Zelllinie (Typ 1 Translokation), gewonnen aus einer extraossären, inguinalen Metastase eines 17-jährigen Mädchens.      |
| SH-SY5Y    | Negativ | Neuroblastom-Zelllinie, gewonnen aus einer Knochenmarksbiopsie eines 4-jährigen Mädchens mit metastasiertem Neuroblastom.  |
| SK-N-MC    | Negativ | ES-Zelllinie (Typ 1 Translokation), gewonnen aus einer supraorbitalen Metastase eines 14-jährigen Mädchen mit Askin-Tumor. |
| T2         | Positiv | TAP-Transporter defizienter Hybrid einer T- und B-lymphoblastoiden Zelllinie.  |
| TC71       | Positiv | ES-Zelllinie (Typ 1 Translokation), gewonnen 1981 aus einem Lokalrezidiv eines 22-jährigen Mannes.                         |

## 2.10. HLA-Status lymphoblastoider Zelllinien

| <u>Zelllinie</u> | <u>HLA - Status</u> |
|------------------|---------------------|
| LCL              | HLA-A*02            |
| AMALA            | HLA-A*02:17         |
| OZB              | HLA-A*02:09         |
| KLO              | HLA-A*02:08         |
| SWEIG007         | HLA-A*29:02         |
| HOML             | HLA-A*03:01         |
| RSH              | HLA-A*68:02         |

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellkulturmethoden

##### 3.1.1. Kultivierung von Adhäsions- und Suspensionszelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank unter standardisierten Bedingungen (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) in T25, T75 oder T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Für alle ES- und Neuroblastom-Zelllinien wurde RPMI-1640 Medium genutzt, welchem 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurde. Zur Kultivierung von Lymphoblastoiden Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*, LCL) und T2-Zelllinien wurden dem RPMI-1640 Medium 1mM Natriumpyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt. Für 293T Verpackungszelllinien wurde DMEM mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und Antibiotika verwendet. T-Zellen wurden in AIM-V Medium mit 5% humanem AB-Serum, sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

Auf den Suspensionszellen wurde alle 2 Tage das Medium gewechselt und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt. Adhärenz Zelllinien bekamen alle 3-4 Tage frisches Medium und wurden 1:5 bis 1:10 geteilt. Hierfür wurde zunächst das Medium komplett entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30-60 Sekunden mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten.

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Hämozytometer ermittelt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit Trypan-Blau gefärbt, um tote Zellen aus der Zählung ausschließen zu können. Die Zellzahl  $c$  wurde anhand folgender Formel berechnet:  $c$  [Zellen/ml] = Anzahl der Zellen / Anzahl der Großquadrate  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times 10^4$ . Anschließend wurde eine geeignete Zellzahl in neuen Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden alle Zelllinien regelmäßig mit Hilfe des *MycoAlert<sup>TM</sup> Mycoplasma Detection Kits* nach Herstelleranleitung getestet. Im Falle einer Verunreinigung wurden die Zellen verworfen und durch frisch aufgetaute Aliquots ersetzt. Tumorzelllinien wurden zusätzlich mittels Durchflusszytometrie auf ihren HLA-A2 Status getestet.



### **3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren der Tumorzelllinien wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml vorgekühltem FCS/10%DMSO suspendiert. Für humane T-Zellen wurden  $3 \times 10^5$  Zellen zentrifugiert und in 1 ml vorgekühltem humanem AB Serum/10%DMSO aufgenommen. Die Kryoröhrchen wurden umgehend für zunächst 12-18 Stunden bei  $-80^\circ\text{C}$  gefroren und danach in einen Stickstofftank ( $-192^\circ\text{C}$ ) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ). Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit ihrem jeweiligen Standardmedium gewaschen, um das zytotoxisch wirkende DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend ihrer Art in Kultur genommen.

## **3.2. Molekularbiologische Analysen**

### **3.2.1. Durchflusszytometrie**

Zur Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst der Kultur entnommen und zweifach mit Puffer (0.5% BSA in PBS) gewaschen. Anschließend wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Färbe-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Zellen mit Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern (mAK) für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Isotyp-Kontrollantikörper verwendet. Zur Analyse im FACSCalibur™ Durchflusszytometer wurden die Zellen nach Inkubation nochmals zweifach gewaschen und in 300  $\mu\text{l}$  gekühltem PBS aufgenommen.

Zytotoxische T Zellen wurden hierbei mit humanen CD8 spezifischen Antikörpern und spezifischen Multimeren (angefertigt durch Prof. Dr. med. Dirk H. Busch, Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) gefärbt.

### **3.2.2. ELISpot**

Mit dem ELISpot wurde die Zytokinausschüttung von Zellen bei Antigenkontakt gemessen. Hierfür wurden die ELISpot-Platten (96-Well-Platten) mit 10  $\mu\text{l/ml}$  mAK beschichtet, die eine Zytokinausschüttung in Form von „Spots“ sichtbar machen. Diese konnten dann mit einem automatisierten ELISpot-Leser ausgezählt werden.

Zur Detektion von INF- $\gamma$  wurde der monoklonale AK 1-D1K zur Detektion von GranzymeB (GB) GB10 verwendet. Am folgenden Tag wurden die Platten vierfach

mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl TZM für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> geblockt, um so unspezifische Bindungen zu verhindern. Die verwendeten T-Zellen wurden nun dreifach mit T-Zellmedium (TZM) gewaschen, aufpipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert, um hierdurch eine erneute Adhäsion der Zellen auf der Platte zu erreichen. Für INF-γ-ELISpots wurde ein Verhältnis von T-Zelle zu Zielzelle von 1:20 gewählt, in GranzymeB-ELISpots wurde eine titrierte Zellzahl mit einem Verhältnis von 10:1 bis 0.15625:1 verwendet. Um eine Verwirbelung der T-Zellen zu vermeiden, wurden die Zielzellen vorsichtig in die Löcher der Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 20 h bei 37°C und 5% Co<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 3 wurden die Platten zunächst 6× mit PBS/0,05% Tween gewaschen und im Anschluss mit 2 µg/ml 7-B6-1 (INF-γ) oder GB11 biotinyliertem mAK über 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Platten erneut 6× mit PBS/0.05% Tween gewaschen und bei Raumtemperatur über 1 h mit 200 µl Streptavidin-HRP (1:100 Verdünnung) inkubiert. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden T-Zellen ohne Zielzelle verwendet.

Eine spezielle ELISpot-Analyse stellt der Alanin-Scan dar. Hierbei werden einzelnen Aminosäuren der Peptidsequenz durch Alanin ersetzt. Daraus ergaben sich 9 Peptide, die auf T2-Zellen geladen in einem ELISpot untersucht wurden.

### **3.2.3. xCELLigence**

Das xCELLigence System arbeitet mit E-Lochplatten, deren Boden mit Goldelektroden versehen sind. So lassen sich in einem schwachen elektrischen Feld mittels elektrischer Impedanzmessung Spannungsunterschiede zwischen Zellkultur und Mikroelektroden-Sensoren in Echtzeit detektieren. Veränderungen in der Zellkultur im Gegensatz zu klassischen Endpunkt-Assays können dadurch dynamisch beobachtet werden.

Zunächst wurde die Tumorzelllinien A673 und SK-N-MC auf die Platte ausgelegt, um ihnen eine adäquate Adhäsion an den Boden der Platten zu ermöglichen. Hierfür wurden  $1 \times 10^4$  A673-Zellen pro Loch beziehungsweise  $2.5 \times 10^4$  Zellen SK-N-MC-Zellen pro well pipettiert. Die spezifischen T-Zellen wurden nach 48 h in titrierter Anzahl in einem Verhältnis spezifische T-Zelle zu Tumorzelle von 20:1 bis 0.3:1 auf die Tumorzellen aufgetragen. Analysiert wurde über eine Zeitspanne von 5 Tagen mit Messabständen von 15 min. Als Negativkontrolle wurden Tumorzellen allein mit Medium genutzt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

### **3.3. Analyse des T-Zell-Rezeptor-V $\alpha$ $\beta$ -Repertoires**

#### **3.3.1. RNS-Isolation**

Zur Isolation von RNS wurden  $1 \times 10^7$  Zellen abzentrifugiert, in 1 ml TriReagent aufgenommen und mit 100  $\mu$ l BCP/ml TriReagent für 5-15 min inkubiert. Um die Suspension in Phasen aufzutrennen, wurde diese nun für 10-15 min bei  $12000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die obere Phase enthielt dann die RNS, die mittlere die DNS und die untere Phase die Proteine.

Die RNS wurde in ein neues Röhrchen überführt und nach Zugabe von 500  $\mu$ l Isopropanol für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (8 min,  $12000 \times g$ ) wurde die RNS mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und über 5 min bei  $7500 \times g$  zentrifugiert und kurz luftgetrocknet. Abschließend wurde die RNS in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und der RNS-Gehalt am Nanophotometer gemessen.

#### **3.3.2. Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion**

Zur Identifikation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des ausgewählten T-Zellklons wurde im Anschluss aus der isolierten RNS mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) komplementäre DNS (cDNS) hergestellt, die als Ausgangsprodukt für die Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigt wurde. Die PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für bestimmte Sequenzabschnitte der DNS, bei der PCR-Produkte nach Beendigung aller Amplifikationszyklen mittels elektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden können.

Für die Reverse Transkription wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* genutzt. Zunächst wurde für jeden einzelnen Primer eine spezifische Stammlösung aus einem geeigneten RT Puffer, RT Random Primern, Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP Mix) und MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transkriptase erstellt. Jedem Reaktionsansatz wurde 1  $\mu$ g aufgereinigte RNS in 14,2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O beigemischt, so dass das Reaktionsgesamtvolumen 20  $\mu$ l betrug.

### cDNS Synthese:

#### PCR Stammlösung:

|   |        |
|---|--------|
| RT Puffer (10×)                               | 2.0 µl |
| RT Random Primer (10×)                        | 2.0 µl |
| dNTP Mix (100 mM)                             | 0.8 µl |
| Multiscribe® reverse Transkriptase (50 U/ µl) | 1.0 µl |

Zugabe von RNS (1 µg) in 14.2 µl ddH<sub>2</sub>O

#### Systematischer Ablauf:

|                      |      |         |
|----------------------|------|---------|
| Denaturierung        | 25°C | 10 min  |
| Primerhybridisierung | 37°C | 120 min |
| Elongation           | 85°C | 5 min   |
|                      | 4°C  | ∞       |

### **3.3.3. Identifikation des $\alpha$ - und $\beta$ -Repertoires des T-Zellrezeptors mittels PCR**

Nach RNS-Isolation und cDNS-Synthese wurden die Gensegmente der variablen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des T-Zellrezeptors mit spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und nach Aufreinigung sequenziert.

Hierfür wurden 34 spezifische Primer der  $\alpha$ -Kette (5'V $\alpha$ x) und 35 spezifische Primer der  $\beta$ -Kette (5'V $\beta$ x) aus der variablen Region in verschiedenen Ansätzen mit einem 3'Primer aus der konstanten Region kombiniert. Hierdurch sollte das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Repertoire des TZR identifiziert werden. Als Kontrolle dienten Primerpaare aus dem konstanten Rezeptorbereich. Die PCR wurde mit Hilfe des *AccuPrime Taq DNA Polymerase System* durchgeführt.

#### PCR V $\alpha$ -Repertoire:

|   |        |
|---|--------|
| ddH <sub>2</sub> O                      | 18 µl  |
| Puffer I (10×)                          | 2.5 µl |
| P-5'aST (5 µM)                          | 0.5 µl |
| P-3'aST (5 µM)                          | 0.5 µl |
| 3'T-Ca (5 µM)                           | 1.0 µl |
| Variable $\alpha$ -Ketten Primer (5 µM) | 1.5 µl |
| AccuPrime Polymerase (2 U/µl)           | 0.5 µl |

### PCR V $\beta$ -Repertoire:

|   |             |
|---|-------------|
| ddH <sub>2</sub> O                          | 18 $\mu$ l  |
| Puffer I (10 $\times$ )                     | 2.5 $\mu$ l |
| P-5'bST (5 $\mu$ M)                         | 0.5 $\mu$ l |
| P-3'bST (5 $\mu$ M)                         | 0.5 $\mu$ l |
| 3'T-CbII (5 $\mu$ M)                        | 1.0 $\mu$ l |
| Variable $\beta$ -Ketten Primer (5 $\mu$ M) | 1.5 $\mu$ l |
| AccuPrime Polymerase (2 U/ $\mu$ l)         | 0.5 $\mu$ l |

### Systematischer Ablauf:

|                       |      |          |               |
|-----------------------|------|----------|---------------|
| Denaturierung:        | 94°C | 6 min    | } 40 $\times$ |
|                       | 94°C | 1 min    |               |
| Primerhybridisierung: | 54°C | 1 min    |               |
| Elongation:           | 68°C | 1 min    |               |
|                       | 68°C | 7 min    |               |
|                       | 4°C  | $\infty$ |               |

### 3.3.4. Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Die Separation der amplifizierten DNS-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierfür wurde eine 2%-Agarose-Lösung in TAE-Puffer angefertigt und für 2-3 min im Mikrowellenofen erhitzt. Bevor die Flüssigkeit in den Gelträger gegossen wurde, wurden 2  $\mu$ l Ethidiumbromid zugefügt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren der DNS-Fragmente und macht sie so unter UV-Licht sichtbar. Nach ca. 45 min wurden jeweils 24  $\mu$ l der zu analysierende DNS in die Taschen des ausgehärteten Gels eingebracht und die elektrophoretische Auftrennung mit 5-7 V/cm in TAE-Puffer gestartet. Die Lösung enthielt wenigstens 0.5  $\mu$ g DNS in H<sub>2</sub>O verdünnt und 4  $\mu$ l *Blue Juice Gel Loading Puffer*. Zur Bestimmung der Laufweite der DNS-Banden wurde ein 1 Kb Leiter genutzt. Zur Visualisierung der RNS durch Interkalation mit Ethidiumbromid kam ein UV-Transluminator zur Anwendung. Zur Extraktion relevanter DNS-Banden wurde das *StrataPrep<sup>®</sup> DNA Gel Extraction Kit* genutzt. Abschließend erfolgte die Sequenzierung durch die Firma Sequiserve.

### 3.3.5. *In silico*-Analyse der variablen Bereiche von $\alpha$ - und $\beta$ -Kette

Um eine vollständige Rezeptorsequenz zu generieren, wurden die Sequenzen mit der internationalen Datenbank IMGT (ImMunoGeneTics) abgeglichen und die ermittelten variablen Rezeptorbereiche um die jeweils fehlenden Sequenzabschnitte ergänzt. Hierbei wurde darauf geachtet, Leserasterverschiebungen auszuschließen. Es wurden nun Primer entwickelt, welche die komplette  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette umfassten.

Für die  $\alpha$ - Kette wurden die Primer HOXD11<sup>2G12</sup>Va1sN und HOXD11<sup>2G12</sup>Va1asE generiert, für die  $\beta$ -Kette die Primer HOXD11<sup>2G12</sup>Vb8sN und HOXD11<sup>2G12</sup>Vb8asE. Mit Hilfe der Primer konnte nun mittels PCR die vollständige  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette amplifiziert und in Plasmide geklont werden. Bevor ein komplettes T-Zellrezeptor-Konstrukt entworfen wurde, wurden die Plasmidsequenzen sequenziert und erneut mit dem Ergebnis der *in silico* Analyse abgeglichen.

PCR Zusammensetzung TZR  $\alpha$ -Kette:

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| ddH <sub>2</sub> O                | 31.5 $\mu$ l |
| Native Plus Puffer (10 $\times$ ) | 5.0 $\mu$ l  |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Va1sN      | 5.0 $\mu$ l  |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Va1asE     | 5.0 $\mu$ l  |
| dNTPs (100 mM)                    | 2.0 $\mu$ l  |
| 2G12 cDNS                         | 1.0 $\mu$ l  |
| Pfu Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)   | 1.0 $\mu$ l  |

Systematischer Ablauf:

|      |          |   |             |
|------|----------|---|-------------|
| 94°C | 2 min    |   |             |
| 94°C | 30 s     | } | 5 $\times$  |
| 58°C | 30 s     |   |             |
| 72°C | 2 min    |   |             |
| 94°C | 30 s     | } | 40 $\times$ |
| 62°C | 30 s     |   |             |
| 72°C | 2 min    |   |             |
| 72°C | 10 min   |   |             |
| 4°C  | $\infty$ |   |             |

### PCR Zusammensetzung TZR $\beta$ -Kette:

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| ddH <sub>2</sub> O                | 31.5 $\mu$ l |
| Native Plus Puffer (10 $\times$ ) | 5.0 $\mu$ l  |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Vb8sN      | 5.0 $\mu$ l  |
| HOXD11 <sup>2G12</sup> Vb8asE     | 5.0 $\mu$ l  |
| dNTPs (100 mM)                    | 2.0 $\mu$ l  |
| 2G12 cDNS                         | 1.0 $\mu$ l  |
| Pfu Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)   | 1.0 $\mu$ l  |

### Systematischer Ablauf:

|      |          |   |             |
|------|----------|---|-------------|
| 94°C | 2 min    |   |             |
| 94°C | 30 s     | } | 5 $\times$  |
| 62°C | 30 s     |   |             |
| 72°C | 2 min    |   |             |
| 94°C | 30 s     | } | 40 $\times$ |
| 64°C | 30 s     |   |             |
| 72°C | 2 min    |   |             |
| 72°C | 10 min   |   |             |
| 4°C  | $\infty$ |   |             |

### 3.3.6. Klonierung des T-Zellrezeptors

Im nächsten Schritt sollte der T-Zell-Rezeptor unter Verwendung eines retroviralen Transfers in die Zellen eingebracht werden. Die zunächst identifizierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wurde durch ein P2A (*self cleaving*)-Element zu einem kompletten TZR-Konstrukt verbunden. Dieses wurde anschließend von der Firma GeneArt synthetisiert und in einen retroviralen pMP71-Vektor subkloniert. Das TZR-Konstrukt wurde hier sowohl als Wildtyp, als auch human-codonoptimiert und minimalmurinisiert generiert.

### 3.3.7. Mini- und Maxi-Plasmidpreparation

Um die erhaltene Plasmidmenge zu expandieren, wurde eine Minipreparation durchgeführt. Hierfür wurden One Shot<sup>®</sup> Top 10 E.coli Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Plasmid und Bakterien wurden hierfür für 30 min auf Eis inkubiert und dann für den Hitzeschock 30 s in ein 42°C heißes Wasserbad getaucht und anschließend wieder auf Eis gelegt. Nun wurden 250  $\mu$ l vorgewärmtes S.O.C. Medium zur Suspen-

sion gegeben und wenigstens 60 min bei 275 rpm und 37°C zentrifugiert. Um eine erfolgreiche Plasmidtransduktion sicherzustellen, wurden die Zellen nun auf einer LB-Platte ausgesät. Ampicillin oder Kanamycin wurde als Selektionsmarker genutzt. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert und die Klone, welche das Plasmid enthalten, in 5 ml (Mini-Preparation) oder 400 ml (Maxi-Preparation) LB-Medium weiter kultiviert. Für die Plasmidpreparation großer Plasmidmengen wurde das *JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit* genutzt, bei kleineren Mengen Plasmid das *NucleoSpin® Plasmid Kit*. Beide wurden nach Herstelleranleitung bearbeitet. Der DNS-Gehalt wurde mit Hilfe eines Nanophotometers gemessen. Für eine erneute Kontrolle der DNS-Sequenz wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die gewonnene DNS wurde hierfür mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI über 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und nach Elektrophorese sequenziert.

Restriktionsverdau Zusammensetzung:

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| ddH <sub>2</sub> O | 14 µl          |
| Plasmid-DNS        | < 1 µg in 3 µl |
| Puffer (10×)       | 2 µl           |
| EcoRI (10 U/µl)    | 0.5 µl         |
| NotI (10 U/µl)     | 0.5 µl         |

### 3.4. Isolation von T-Zell-Subpopulationen

#### 3.4.1. Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Das zur Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) verwendete humane Vollblut stammte von gesunden Spendern und wurde vom DRK-Blutspendedienst (Baden-Württemberg-Hessen) innerhalb von 24 Stunden nach Abnahme geliefert. Das Blutkonzentrat wurde zunächst in ein 50 ml Falcon überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch Schwenken vermischt. In neue 50 ml Falcons wurden dann je 10 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit 25 ml der Blutsuspension überschichtet. Zur Auftrennung der Blutbestandteile wurde die Suspension bei 23°C für 30 min bei 400 × g zentrifugiert und abschließend ungebremst zum Stillstand gebracht, um eine erneute Vermischung zu vermeiden.



Nun konnten die PBMC zwischen oberer Plasma-Schicht und unterer Ficoll-Schicht mit einer 10 ml Pipette abgetragen, in ein neues Falcon überführt und mit PBS gewaschen werden. Die Zellen wurden gezählt und direkt zur Isolation einzelner Zellgruppen genutzt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.4.2. Isolation von $\text{CD8}^+$ -T-Zellen**

Um eine reine Zellpopulation  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen aus PBMC zu gewinnen wurden zunächst alle übrigen Zellen eines HLA-A\*02:01-negativen Spenders mit Hilfe des *CD8<sup>+</sup> Isolations Kit* nach Anleitung des Herstellers mit magnetischen Mikropartikeln markiert und entfernt. Die zunächst isolierten PBMC wurden hierfür zweifach gewaschen und in  $40\ \mu\text{l}$  MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Dann wurden  $10\ \mu\text{l}$  einer Mischung aus biotinylierten Antikörpern pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt und 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden nochmals  $30\ \mu\text{l}$  MACS-Puffer und  $20\ \mu\text{l}$  Mikrobeads pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben und weitere 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen konnten nun gewaschen, in  $500\ \mu\text{l}/10^8$  Zellen MACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe eines Magneten separiert werden. Die Separierung erfolgte durch eine aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehende Säule, welche in einen Permanentmagneten eingesetzt wurde. Magnetisch markierte Zellen wurden in der Säule festgehalten, während die unmarkierten  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen nach dem Durchfließen der Säule aufgefangen wurden. Die Säule wurde, um sicherzustellen, dass alle  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen die Säule durchlaufen haben, dreifach mit MACS-Puffer gespült. Für die Isolation von naiven  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen aus der erhaltenen  $\text{CD8}^+$ -T-Zellpopulation wurden  $\text{CCR7}^-$ ,  $\text{CD45RA}^+$ -Zellen mit Hilfe des *Naive Pan T Cell Isolation Kit* nach oben genanntem Protokoll isoliert. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde jeweils mittels Durchflusszytometrie bestätigt.

### **3.4.3. Generierung von T-Gedächtniszellen mit Stammzelleigenschaften ( $\text{T}_{\text{SCM}}$ )**

Um T-Gedächtniszellen mit Stammzelleigenschaften ( $\text{T}_{\text{SCM}}$ ) zu generieren, wurden zunächst isolierte naive T-Zellen mit anti-CD3/CD28 MicroBeads aktiviert. Hierfür wurden nach dem Protokoll von Cieri et al. (Cieri, 2013) vorgegangen und entsprechend  $5 \times 10^5$  naive T-Zellen/ml in T-Zellmedium mit je 5 ng/ml rhIL7 und rhIL15 und einem MikroBead- zu Zell-Verhältnis von 1:1 kultiviert. Die generierten Zellen wurden dann mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihres Oberflächenprofils auf

die relevanten Oberflächenmarker CD45RO, CD45RA, CCR7, CD95 und CD8 kontrolliert.

### **3.5. Transduktion von T<sub>SCM</sub> mit HOXD11<sup>2G12</sup> spezifischem T-Zellrezeptor**

T<sub>SCM</sub> wurden mittels retroviraler Infektion mit dem HOXD11<sup>2G12</sup> spezifischen TZR transduziert. Am ersten Tag wurden hierfür  $2 \times 10^5$  293T Verpackungszellen in 3 ml 293T Medium auf einer 6-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das retrovirale Plasmid, welches den TZR enthielt, zu den Zellen gegeben.

Für jeden Ansatz wurden 200 µl DMEM mit 9 µl TransIT Transfektionsreagenz für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 µg retrovirales Plasmid hinzugegeben und wiederum 30 min inkubiert, um eine Komplexbildung zwischen Plasmid und Transfektionsreagenz zu gewährleisten. Am selben Tag wurden T<sub>SCM</sub> isoliert und mit anti-CD3/CD28 Mikrobeads (3:1) sowie 5 ng/ml rhIL7 und 5 ng/ml rhIL15 aktiviert. Um den Kontakt zwischen T-Zellen und Retrovirus und somit die Aufnahme in die Zelle zu verbessern, wurde die Transduktion in mit 5 µg Retronectin beschichteten 24-Lochplatten durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Transduktion mittels Zentrifugation durchgeführt. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  T-Zellen mit 1 ml Virusüberstand, Zytokinen, 1% HEPES und mit 4 µg/ml Protaminsulfat inkubiert und anschließend über 90 min bei 32°C zentrifugiert. Am Folgetag wurden die T-Zellen 1:2 geteilt und die Transduktion wie am Vortag durchgeführt. Das Ergebnis der Transduktion wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

### **3.6. Statistik**

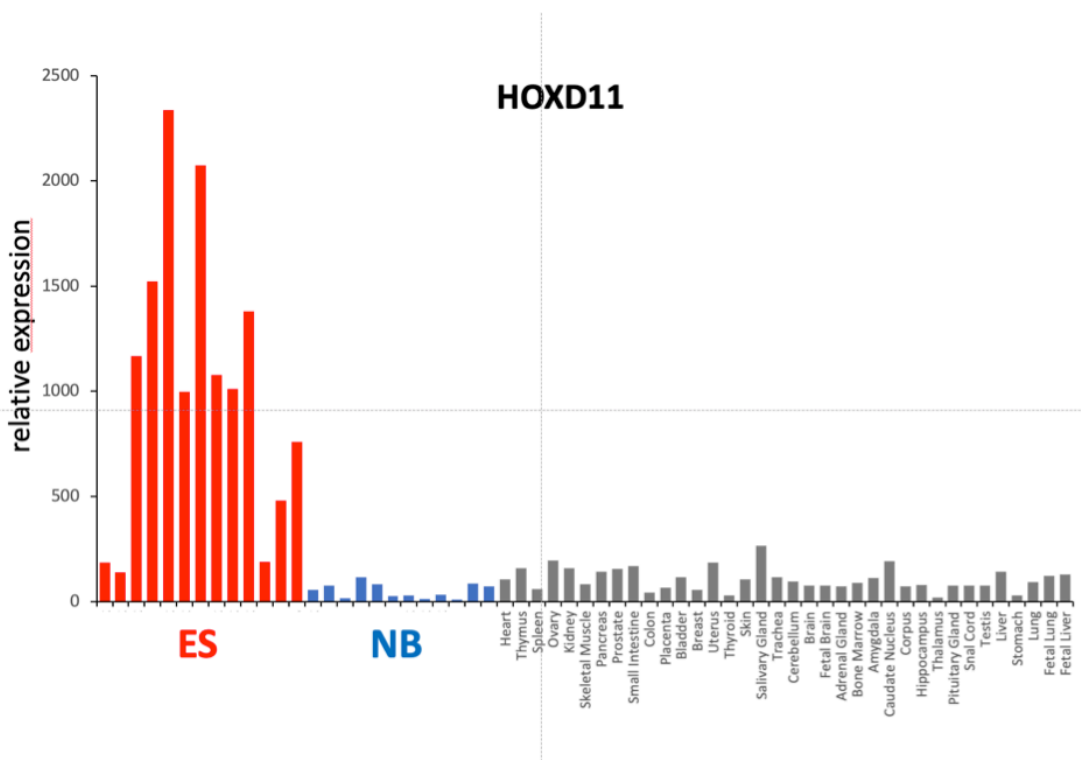
Für normalverteilte Daten wurde die deskriptive Statistik mit Mittelwert und Standardfehler (MW±Stdf.) angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels ungepaartem t-Test mit zwei Stichproben mit Prism 5 (GraphPad Software, Prism 5, Version 5.0) durchgeführt. P-Werte  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant festgelegt (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$ ). Zur besseren Übersicht wurde in einigen Abbildungen nur eine Auswahl der signifikanten Unterschiede graphisch hervorgehoben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorversuche der Arbeitsgruppe Richter

#### 4.1.1. Identifikation von HOXD11 als geeignetes Zielantigen

Um HOXD11 als geeignetes Zielantigen für die adoptive T-Zelltherapie des ES auszuwählen, wurde die Expressionsstärke von HOXD11 in ES-Zellen und Normalgewebe analysiert. Hierfür wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt und mittels qRT-PCR analysiert. In Abbildung 1 ist die Expression von HOXD11 zunächst in verschiedenen ES Patienten aufgezeigt. Generell ist hierbei eine starke Expression bei sämtlichen Patienten erkennbar. Im Normalgewebe hingegen ist die Expression vergleichsweise sehr gering; die stärkste Reaktion zeigt sich hier noch in Speicheldrüsengewebe (*salivary gland*).



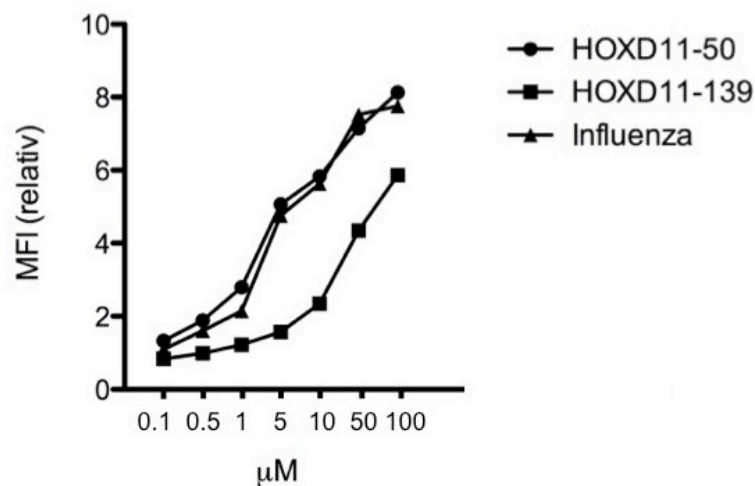
**Abbildung 1:** Expressionsprofil von HOXD11 bei ES Patienten (rot) verglichen mit Neuroblastom Tumoren (NB; blau), sowie Normalgewebe (grau). Hierfür wurde RNS von ES Patienten und Neuroblastom Patienten auf HG U133A Arrays hybridisiert (Affymetrix; GSE 1825, GSE 15757 (Burdach, 2009)) und mit publizierten Microarray Daten aus Normalgewebe verglichen (GSE 2361). Jeder Balken repräsentiert hierbei das Expressionssignal eines individuellen Arrays (von Heyking, 2016).

#### 4.1.2. Auswahl eines geeigneten Peptidepitops mittels in silico-Analyse

Um ein geeignetes Peptidepitop aus der HOXD11 Antigenregion auszuwählen, wurden Peptidepitope hinsichtlich ihrer HLA-A\*02:01 Bindung, proteasomaler Spaltung und TAP Transport analysiert und mit einem gut untersuchten Influenza Peptid verglichen. Für die Bindungsanalyse wurden zunächst die Online-Datenbanken NetCTL1.2, Bimas und SYFPEITHI herangezogen (Tabelle 1). Zwei der vier Epitope (HOXD11<sup>139</sup> und HOXD11<sup>50</sup>) wurden in einem HLA-A\*02:01 Bindungsassay genauer untersucht (Abb. 2). HOXD11<sup>50</sup> wies dabei die stärkere HLA-Bindung auf und wurde somit als Peptidepitop für diese Arbeit ausgewählt.

| HOXD 11    |                  | Score         |               |           |
|------------|------------------|---------------|---------------|-----------|
| Start AA   | Sequenz          | NetCTL1.2     | Bimas         | SYFPEITHI |
|            | Influenza        | 1.2885        | 550.927       | 30        |
| 15         | YLPGCAYYV        | 1.4651        | 1759.66       | 25        |
| <b>139</b> | <b>VLFKAPEPV</b> | <b>1.2203</b> | <b>214.37</b> | <b>22</b> |
| <b>50</b>  | <b>NLAPHVQPV</b> | <b>1.1758</b> | <b>159.97</b> | <b>28</b> |
| 304        | NLTDRQVKI        | 0.909         | 42.774        | 22        |

**Tabelle 1:** *In silico* Bindungsanalyse mehrerer HOXD11 Peptidepitope. Die Bindungsaffinität wird mittels Punktwerten vorausgesagt.



**Abbildung 2:** Um eine Präsentation von HOXD11 Peptiden auf HLA-A\*02:01 aus der vorherigen *in silico* Analyse zu bestätigen, wurde eine Analyse mittels Bindungsassay durchgeführt. Hierfür wurden TAP Transporter defiziente T2-Zellen mit 50 mM, 100 mM, sowie einer titrierten Menge HOXD11-Peptidnonameren beladen und für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. HLA-A\*02:01 Moleküle auf der Zelloberfläche wurden dann mit einem FITC-anti-HLA-A2 Antikörper angefärbt und die Fluoreszenzintensität mit einem gut etablierten Influenzapeptid verglichen.

### **4.1.3. Generierung HLA-A\*02:01 und HOXD11-positiver T-Zellen und durchflusszytometrische Sortierung mittels Antikörper-Markierung**

In Vorarbeiten wurden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-A\*02:01-negativen, gesunden Spenders selektiert und mit dendritischen Zellen eines HLA-A\*02:01-positiven Spenders inkubiert, welche zunächst mit HOXD11<sup>50</sup> Peptid beladen wurden.

Nach 14 Tagen konnten die Zellen mit HLA-A2/HOXD11<sup>50</sup> PE-Multimer und Anti-CD8-Antikörper markiert und die zweifach positiven T-Zellen mittels FACS im Institut für medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München selektiert werden. Die gewonnenen Zellen wurden dann zur Generierung monoklonaler Kulturen mittels Grenzverdünnung ausgesät, expandiert und für die folgenden Versuche verwendet.

## **4.2. Auswahl eines geeigneten T-Zellklons**

### **4.2.1. Peptidspezifität im Kontext von HLA-A\*02:01**

Mit Hilfe von ELISpot-Ansätzen wurden die vier T-Zellklone (2B1, 2B9, 2A81 und 2G12) hinsichtlich ihrer Peptidspezifität im Kontext von HLA-A\*02:01 weiter analysiert. Hierfür wurden als HLA-A\*02:01-positive und HOXD11-positive Zellen die ES-Zelllinien A673 und TC71 verwendet, die von HOXD11-Antigen-spezifischen, allorestingierten, zytotoxischen T Zellen erkannt werden sollten. Als HLA-A\*02:01-negative ES-Zelllinien wurden die Zelllinien SB-KMS-KS1 und SK-N-MC sowie die ebenfalls HLA-A\*02:01-negative, chronische myeloische Leukämie (CML) Zelllinie K562 verwendet, welche zu keiner T-Zellreaktion führen sollten. Außerdem wurden T2-Zellen mit HOXD11<sup>50</sup> Peptid (T2<sub>HOX</sub>) und in einem weiteren Ansatz T2-Zellen mit Influenza-Peptid (T2<sub>INF</sub>) beladen. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen ohne Zugabe einer weiteren Zelllinie mitgeführt. Die INF- $\gamma$ -Ausschüttung der verschiedenen Zelllinien wurden jeweils mit den alleinigen T-Zellen verglichen.

Der T-Zellklon 2B1 (Abb. 3) zeigte die stärkste INF- $\gamma$ -Ausschüttung in der Reaktion mit den HLA-A\*02:01-positiven ES-Zelllinien A673 (433 $\pm$ 71; p=0.0006) und TC71 (Spots/2000 Zellen: 988 $\pm$ 38; p<0.0001) sowie mit T2<sub>HOX</sub>-Zellen (478 $\pm$ 47; p=0.0001). Die mit HOX-Peptid beladenen T2-Zellen führten zu einer signifikant stärkeren INF- $\gamma$ -Ausschüttung im Vergleich zu den mit Influenza beladenen T2-Zellen (p<0.0001).

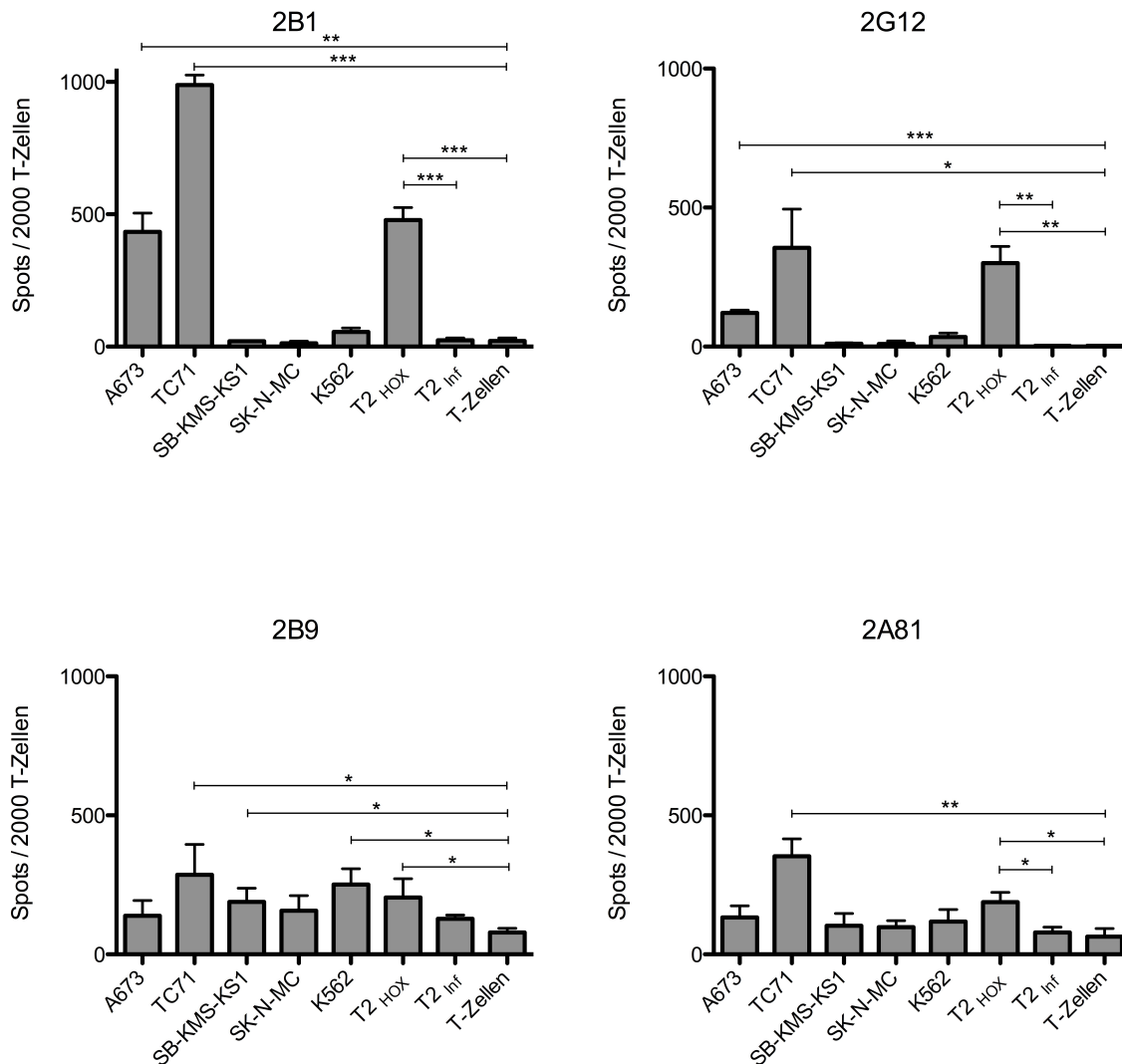
Die übrigen HLA-A\*02:01-negativen Zelllinien SB-KMS-KS-1 ( $p=0.8520$ ) und SK-N-MC ( $p=0.3297$ ), sowie auch T<sub>INF</sub>-Zellen ( $p=0.8223$ ) zeigten keine Reaktion. Eine Hintergrundaktivität der alleinigen T-Zellen war ebenfalls nicht ersichtlich. Lediglich in der Versuchsreihe der CML-Linie K562 ergab sich eine geringe Reaktion ( $55\pm 15$ ;  $p=0.0368$ ).

Der T-Zellklon 2G12 (Abb. 3) zeigte ein vergleichbares Reaktionsmuster mit erneut stärkster zellulärer Reaktion auf A673 ( $121\pm 10$ ;  $p<0.0001$ ), TC71 ( $355\pm 139$ ;  $p=0.0119$ ) und T<sub>HOX</sub> ( $300\pm 61$ ;  $p=0.0011$ ). Die INF- $\gamma$ -Ausschüttung war bei den T<sub>HOX</sub>-Zellen auch gegenüber den T<sub>INF</sub>-Zellen ( $3\pm 3$ ) signifikant erhöht ( $p=0.0011$ ). Die HLA-A\*02:01-negativen Zelllinien SK-N-MC ( $10\pm 11$ ;  $p=0.3351$ ) und SB-KMS-KS1 ( $11\pm 3$ ;  $p=0.0176$ ) führten zu einer sehr geringen Reaktion. Die HLA-A\*02:01-negative CML-Linie K562 führte auch hier nur zu einer geringen INF- $\gamma$ -Ausschüttung ( $34\pm 14$ ;  $p=0.0177$ ).

Die Messung der INF- $\gamma$ -Ausschüttung des T-Zellklons 2B9 (Abb. 3) ergab ein sehr unspezifisches Reaktionsmuster. Die Hintergrundaktivität der alleinigen T-Zellen zeigte im Vergleich zu den Messungen mit 2B1 ( $22\pm 12$ ) und 2G12 ( $3\pm 2$ ) etwas erhöhte Zellantworten ( $79\pm 15$ ). Eine spezifische Reaktion der HLA-A\*02:01-negativen und Antigen-positiven Zelllinie SK-N-MC war nicht erkennbar ( $157\pm 54$ ;  $p=0.0715$ ). Auch für die Zelllinie A673 ergaben sich keine signifikant erhöhten Werte ( $139\pm 55$ ;  $p=0.1389$ ). Die Erkennung der T<sub>HOX</sub>-Zellen war im Vergleich zu T<sub>INF</sub>-Zellen ebenfalls nicht signifikant ( $p=0.1271$ ). Zwar ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede der Zelllinien TC71 ( $286\pm 109$ ;  $p=0.0310$ ) und T<sub>HOX</sub> ( $204\pm 68$ ;  $p=0.0352$ ) gegenüber den alleinigen T-Zellen, jedoch waren auch die HLA-A\*02:01-negative Ewing Zelllinie SB-KMS-KS1 ( $189\pm 50$ ;  $p=0.0214$ ) sowie die Negativkontrolle T<sub>INF</sub> ( $128\pm 13$ ;  $p=0.0139$ ) signifikant unterschiedlich. Auch die INF- $\gamma$ -Ausschüttung der CML-Zelllinie K562 ( $251\pm 57$ ;  $p=0.0071$ ) ergab signifikante Unterschiede zu den T-Zellen. Insgesamt zeigte sich bei der Messung der INF- $\gamma$ -Ausschüttung des T-Zellklons 2B9 ein sehr unspezifisches Muster; jede der untersuchten Zelllinien zeigte eine vergleichsweise moderat erhöhte Immunantwort.

Der T-Zellklon 2A81 (Abb. 3) ergab ebenfalls eine Hintergrundaktivität ( $63\pm 29$ ). Die Erkennung von A673 ( $133\pm 42$ ;  $p=0.0770$ ) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den alleinigen T-Zellen; TC71 ( $353\pm 63$ ;  $p=0.0019$ ) und T<sub>HOX</sub>-Zellen ( $188\pm 36$ ;  $p=0.0095$ ) hingegen schon. Auch die T<sub>HOX</sub>- gegenüber den T<sub>INF</sub>-Zellen ( $79\pm 19$ ;  $p=0.0094$ ) ergaben signifikant erhöhte Werte. Für die Zelllinien SB-KMS-KS1

(103±44; p=0.2604), SK-N-MC (98±24; p=0.1870), K562 (118±43; p=0.1449) waren keine signifikante Unterschiede im Vergleich zu den alleinigen T-Zellen erkennbar.



**Abbildung 3:** ELISpots zur Messung der INF- $\gamma$ -Ausschüttung mit den T-Zellklonen 2B1, 2G12, 2B9 und 2A81 zur Testung der Peptidspezifität.

#### 4.2.2. Kreuzreaktivität der T-Zellklone

Um die potentielle Kreuzreaktivität der T-Zellen genauer zu bestimmen, wurde ein weiterer ELISpot mit MHC-Klasse-I exprimierenden lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) durchgeführt. Vier der getesteten LCL-Linien (KLO, AMALA, OZB, LCL) gehörten der HLA-A\*02-Superfamilie an; weitere zwei lymphoblastoide Zelllinien zählten zu anderen Superfamilien (HOML: HLA-A\*03:01, SWEIG007: HLA-A\*29:02). Die Zelllinie RSH (HLA-A\*68:02) wird ebenfalls der HLA-A\*02-Superfamilie zugerechnet.

Im LCL-ELISpot mit dem T-Zellklon 2B1 (Abb. 4) zeigte sich eine ausgeprägte Reaktion auf die Zellen der HLA-A\*02-Superfamilie LCL (Spots/5000 Zellen:  $1600 \pm 42$ ;  $p < 0.0001$ ), AMALA ( $1516 \pm 7$ ;  $p < 0.0001$ ) und OZB ( $1340 \pm 56$ ;  $p < 0.0001$ ). Eine geringere Reaktion ergab sich bei der HLA-A\*02-positiven KLO-Zelllinie ( $391 \pm 65$ ;  $p = 0.0207$ ). Die Reaktion der T-Zellen im Versuch mit den Zelllinien RSH ( $164 \pm 12$ ;  $p = 0.0134$ ), HOML ( $181 \pm 20$ ;  $p = 0.0422$ ) und SWEIG007 ( $218 \pm 7$ ;  $p = 0.2793$ ) ergab keine höhere INF- $\gamma$ -Ausschüttung im Vergleich zu den alleinigen T-Zellen ( $240 \pm 29$ ).

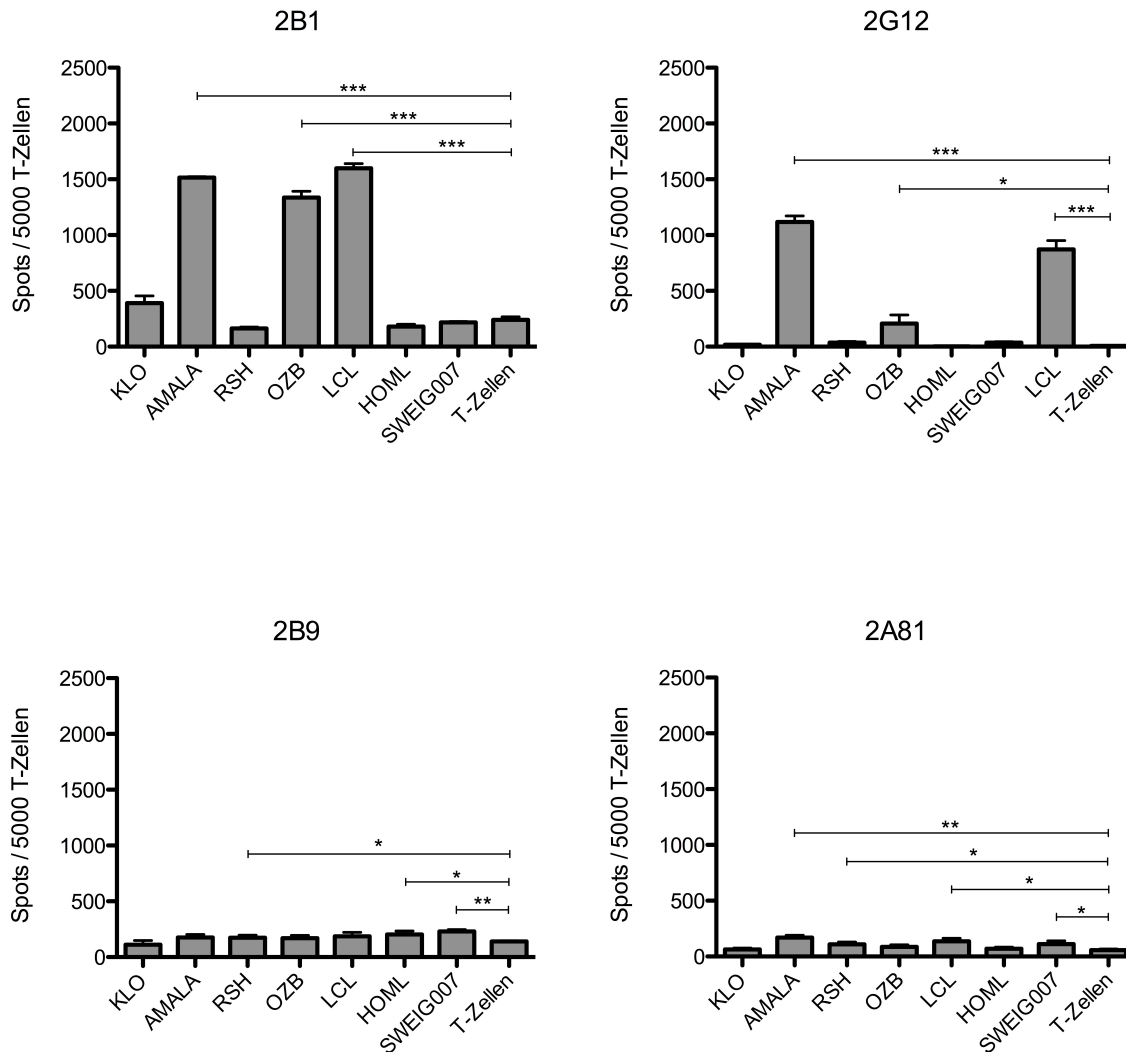
Im LCL-ELISpot mit 2G12 (Abb. 4) wurden ebenfalls die drei Zelllinien AMALA ( $1118 \pm 53$ ;  $p < 0.0001$ ), LCL ( $871 \pm 80$ ;  $p < 0.0001$ ) und OZB ( $207 \pm 77$ ;  $p = 0.0108$ ) mit im Vergleich zu den alleinigen T-Zellen signifikant erhöhten Werten erkannt. Die übrigen Zelllinien zeigten eine sehr geringe INF- $\gamma$ -Ausschüttung (SWEIG007 ( $37 \pm 7$ ;  $p = 0.0028$ ), KLO ( $18 \pm 6$ ;  $p = 0.0453$ ), RSH ( $36 \pm 11$ ;  $p = 0.0130$ ), HOML ( $4 \pm 3$ ;  $p = 0.4050$ )). Diese Unterschiede in der INF- $\gamma$ -Ausschüttung waren rechnerisch zwar mitunter signifikant, jedoch zu gering, um als spezifische Reaktion der T-Zellen zu gelten. Ebenso verzeichneten die alleinigen T-Zellen keine erhöhte Hintergrundaktivität ( $6 \pm 4$ ).

Die unspezifische Reaktion des T-Zellklons 2B9, welche sich bereits im vorherigen ELISpot (Abb. 3) gezeigt hat, bestätigte sich auch im LCL-ELISpot (Abb. 4). Alle Zelllinien inklusive der alleinigen T-Zellen ( $140 \pm 7$ ) ergaben eine unspezifische Zellantwort (KLO ( $111 \pm 39$ ;  $p = 0.2653$ ), AMALA ( $177 \pm 25$ ;  $p = 0.0762$ ), RSH ( $173 \pm 25$ ;  $p = 0.0480$ ), OZB ( $170 \pm 24$ ;  $p = 0.1089$ ), LCL ( $187 \pm 34$ ;  $p = 0.0795$ ), HOML ( $204 \pm 30$ ;  $p = 0.0238$ ), SWEIG007 ( $230 \pm 16$ ;  $p = 0.0009$ )).

Der ELISpot des T-Zellklons 2A81 (Abb. 4) zeigte insgesamt eine geringe INF- $\gamma$ -Ausschüttung auf die getesteten Zelllinien. T-Zellen alleine ( $56 \pm 12$ ) sowie auch KLO ( $63 \pm 13$ ;  $p = 0.5306$ ), OZB ( $86 \pm 19$ ;  $p = 0.0797$ ) und HOML ( $70 \pm 13$ ;  $p = 0.2447$ ) verzeichneten eine statistisch nicht signifikante Reaktion. Die Zelllinien AMALA ( $170 \pm 20$ ;  $p = 0.0010$ ), RSH ( $110 \pm 21$ ;  $p = 0.0182$ ), LCL ( $136 \pm 27$ ;  $p = 0.0098$ ) und SWEIG007 ( $112 \pm 28$ ;  $p = 0.0350$ ) führten zu einer etwas stärkeren INF- $\gamma$ -Ausschüttung. Jedoch war insgesamt die INF- $\gamma$ -Ausschüttung sehr gering und unspezifisch.

In Zusammenschau der Ergebnisse aus den ELISpot-Versuchen ergaben die T-Zellklone 2B1 und 2G12 die spezifischsten Reaktionen, so dass für die folgenden Versuchsansätze zur Identifikation der jeweiligen T-Zellrezeptor-Sequenz nur noch diese beiden T-Zellklone weiter analysiert wurden.



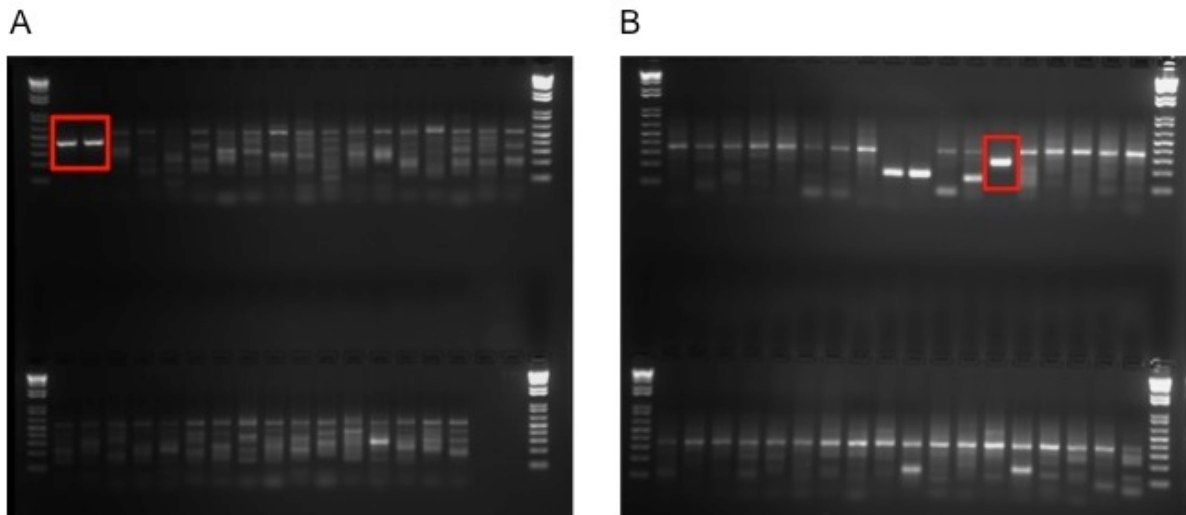


**Abbildung 4:** LCL-ELISpots zur Messung der INF- $\gamma$ -Ausschüttung mit den T-Zellklonen 2B1, 2G12, 2B9 und 2A81 zur Testung der Kreuzreaktivität.

### 4.3. Identifikation des T-Zellrezeptors

#### 4.3.1. Sequenzanalyse der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette der T-Zellklone 2B1 und 2G12

Aus den monoklonalen Kulturen der T-Zellklone 2B1 und 2G12 wurde RNS isoliert, cDNS synthetisiert und mit Hilfe von 34  $\alpha$ - und 35  $\beta$ -Ketten spezifischen Primern die variablen Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette mittels Gelelektrophorese identifiziert und sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass die Sequenzen der T-Zellklone 2B1 und 2G12 identisch waren (Abb. 5) und sich die weitere Analyse somit – auch aufgrund seines besseren Wachstumsverhaltens *in vitro* – auf den Klon 2G12 konzentrierte.



**Abbildung 5:** Gelelektrophorese zur Identifikation der T-Zellrezeptorsequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Aufgetragen mit einem 1kb Leiter konnte für die  $\alpha$ -Kette der Primer Pan V $\alpha$ -1.1 (A, rot) ausgewählt werden. Die  $\beta$ -Kette ergab den Primer V $\beta$ 8 (B, rot).

#### 4.3.2. Komplettierung der Sequenzen von $\alpha$ - und $\beta$ -Kette mittels ImMunoGeneTics (IMGT) durch *in silico*-Analyse

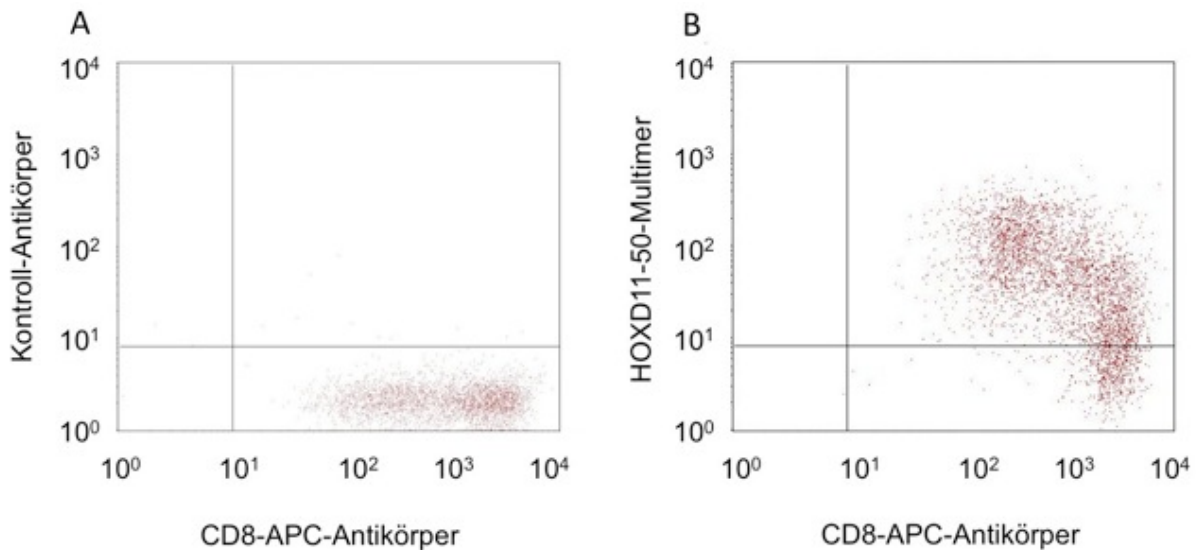
Die Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wurden dann mit Hilfe der internationalen Datenbank IMGT (ImMunoGeneTics) analysiert. Die Analyse ergab für die  $\alpha$ -Kette die Rezeptorkette TRAV8-6\*01 und für die  $\beta$ -Kette die Rezeptorkette TRBV12-3\*01. Die Ketten wurden um die ermittelte Sequenz erweitert und mit dem konstanten Teil sowie dem Signalpeptid komplettiert. Zur Kontrolle der ermittelten Sequenzen wurden spezifische Primer für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette synthetisiert und die Sequenzen mittels PCR und Sequenzierung erneut bestätigt. Anschließend erfolgte die eingehende funktionelle Charakterisierung des T-Zellklons 2G12.

#### 4.4. Peptidspezifität und Reaktivität des ausgewählten T-Zellklons 2G12

##### 4.4.1. Durchflusszytometrie zur Bestätigung der Expression von HOXD11<sup>50</sup> und CD8 in der T-Zellkultur

Die Durchflusszytometrie des T-Zellklons 2G12 zeigte bei Färbung mit einem HOXD11<sup>50</sup>-Multimer und CD8-APC-Antikörper eine große Population CD8 und HOXD11<sup>50</sup>-positiver T-Zellen (Abb. 6A). Im Gegensatz hierzu ergab die Färbung mit einem irrelevantem Peptid ausschließlich eine positive Reaktion auf CD8<sup>+</sup>-Zellen,

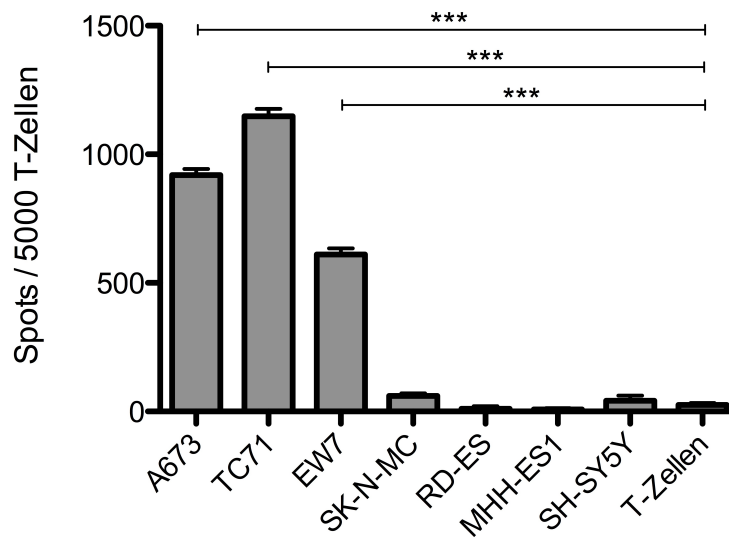
während sich der T-Zellklon 2G12 mit einem irrelevantem Peptid nicht anfärben ließ (Abb. 6B).



**Abbildung 6:** Durchflusszytometrie des T-Zellklons 2G12 gefärbt mit CD8-APC-Antikörper und einem irrelevanten Peptid (A) sowie mit CD8-APC-Antikörper und HOXD11<sup>50</sup>-Multimer (B).

#### 4.4.2. Peptidspezifität und Reaktivität des T-Zellklons 2G12 im Kontext von HLA-A\*02:01

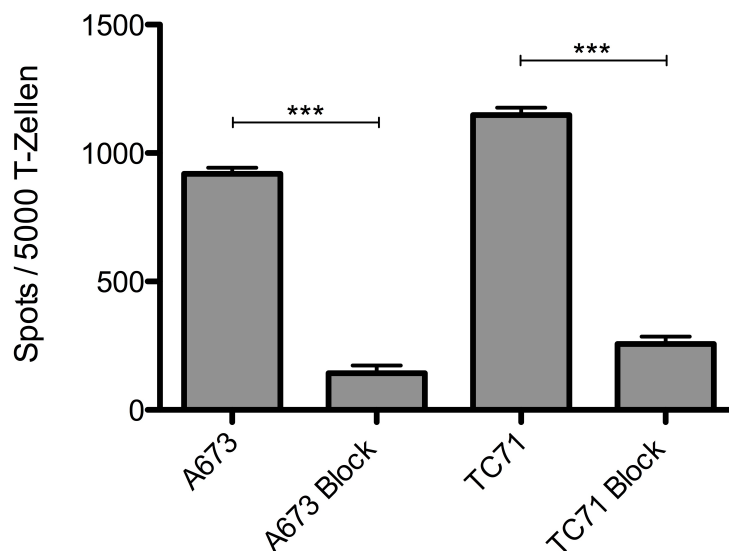
Anschließend erfolgte die Durchführung eines ELISpots des T-Zellklons 2G12 mit unterschiedlichen Tumorzelllinien, um die Peptidspezifität und Reaktivität des T-Zellklons 2G12 im Kontext von HLA-A\*02:01 weiter zu analysieren (Abb. 7). Die ES-Zelllinien A673 (Spots/5000 Zellen:  $920 \pm 24$ ;  $p < 0.0001$ ), TC71 ( $1150 \pm 29$ ;  $p < 0.0001$ ) und EW7 ( $611 \pm 23$ ;  $p < 0.0001$ ) wurden hierbei von den T-Zellklonen erkannt und führten zu einer statistisch signifikant erhöhten INF- $\gamma$ -Ausschüttung. Die HLA-A\*02:01-negativen ES-Zelllinien SK-N-MC ( $61 \pm 10$ ;  $p = 0.0086$ ) und RD-ES ( $11 \pm 10$ ;  $p = 0.0955$ ) sowie auch die HLA-A\*02:01-negative ES-Zelllinie MHH-ES1 ( $8 \pm 5$ ;  $p = 0.038$ ) wurden nur sehr gering erkannt. Die Neuroblastomlinie SH-SY5Y ( $41 \pm 21$ ;  $p = 0.2940$ ) führte ebenfalls nur zu einer sehr geringen INF- $\gamma$ -Ausschüttung.



**Abbildung 7:** ELISpot-Assay des T-Zellklons 2G12. Gemessen wird die INF- $\gamma$ -Ausschüttung der T-Zellen im Kontakt mit unterschiedlichen Tumorzellen.

#### 4.4.3. HLA-A\*02:01 restringierte Peptiderkennung

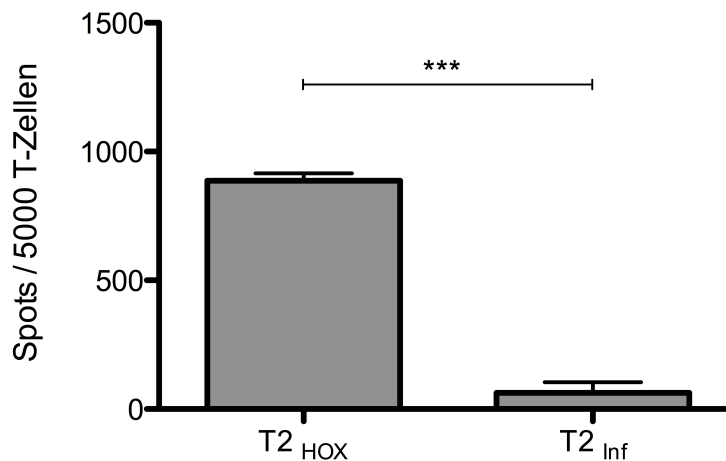
Die Abbildung 8 verdeutlicht, dass die jeweilige INF- $\gamma$ -Ausschüttung bei Blockierung der MHC-I-Bindungsstelle der ES-Zelllinien A673 ( $920 \pm 24$ ) und TC71 ( $1150 \pm 29$ ) durch den Antikörper W6/32 ( $A673_{\text{Block}}$  ( $143 \pm 30$ ;  $p < 0.0001$ ) und ( $TC71_{\text{Block}}$  ( $257 \pm 28$ ;  $p < 0.0001$ )) signifikant geringer war.



**Abbildung 8:** Die Blockierung des MHC-I mittels W6/32 Antikörper führte bei den ES-Zelllinien A673 und TC71 jeweils zu einer signifikant geringeren INF- $\gamma$ -Ausschüttung ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.4.4. T2-Zellen beladen mit HOXD 11<sup>50</sup> und Influenza

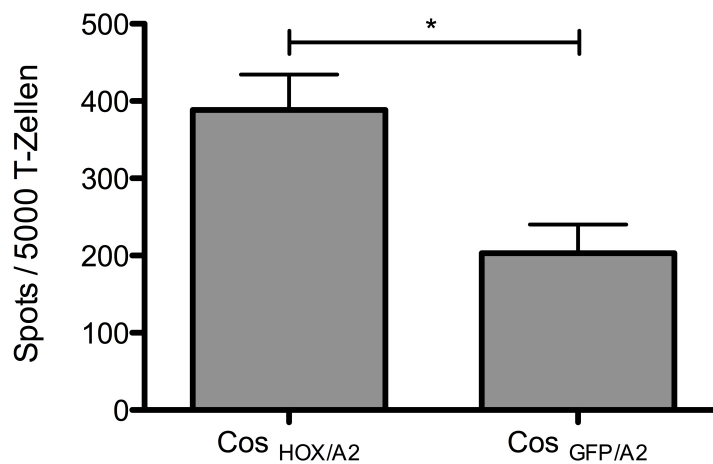
T2-Zellen, die mit HOXD11<sup>50</sup> Peptid (886±30) beladen waren, wurden spezifisch erkannt (Abb. 9). T2-Zellen mit Influenza-Peptid (63±41) lösten hingegen eine signifikant niedrigere Reaktion aus ( $p < 0.0001$ ).



**Abbildung 9:** Der ELISpot-Assay zeigt die INF- $\gamma$ -Ausschüttung bei Peptiderkennung. Die mit HOXD11<sup>50</sup>-Peptid beladenen T2-Zellen zeigten eine spezifische Erkennung. Das irrelevante Influenza Peptid bewirkte eine signifikant niedrigere INF- $\gamma$ -Ausschüttung ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.4.5. Nachweis der korrekten Peptidprozessierung durch Transfektion von Cos7-Zellen

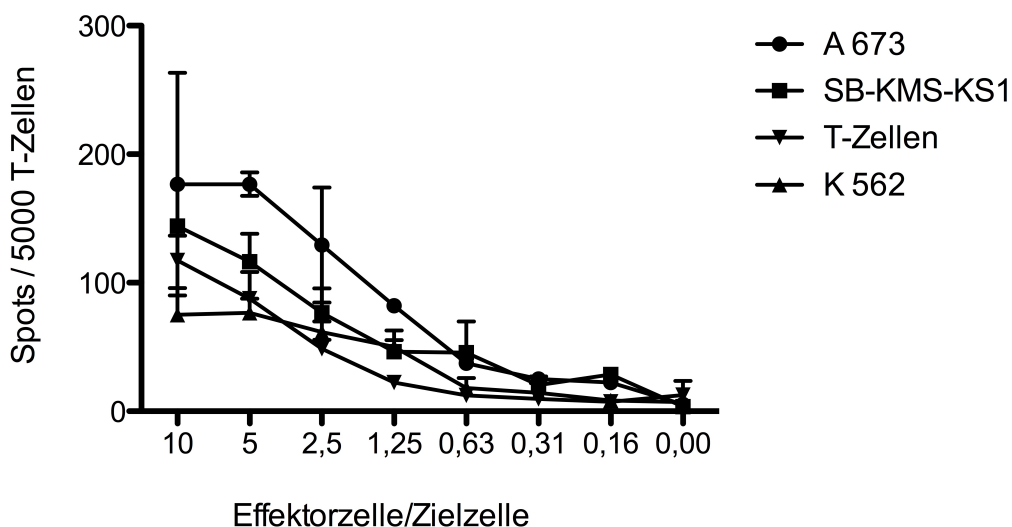
Um eine fehlerfreie Prozessierung des HOXD11<sup>50</sup>-Peptides und HLA-A\*02 nachzuweisen, wurden Cos7-Zellen mit HLA-A\*02:01 und HOXD11 cDNS transfiziert. Als Kontrolle wurden Cos7-Zellen mit dem irrelevanten Antigen GFP und HLA-A\*02:01-cDNS transfiziert. Es konnte eine signifikant höhere INF- $\gamma$ -Ausschüttung ( $p = 0.0116$ ) bei den Cos7-Zellen mit HOXD11/HLA-A\*02:01 (365±52) im Vergleich zu Cos7-Zellen mit GFP/HLA-A\*02:01 (203±37) beobachtet werden (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Cos7-Zellen nach Transfektion mit HOXD11<sup>50</sup>-Peptid und HLA-A\*02 ergaben eine korrekte Prozessierung und Präsentation des Peptides über HLA-A\*02:01.

#### 4.4.6. GranzymeB-Ausschüttung in Abhängigkeit von Verhältnis der Effektor- zur Zielzelle

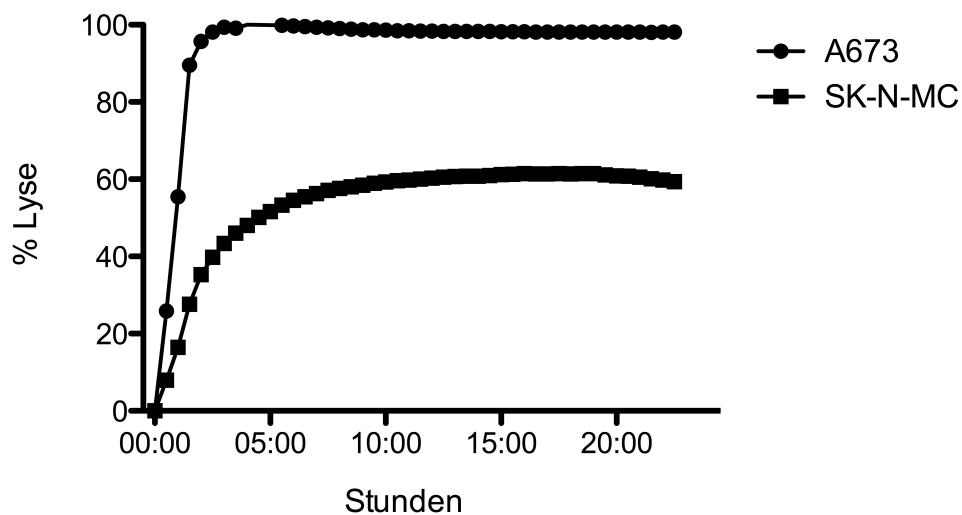
Die T-Zellen wurden in titrierter Menge mit jeweils 20.000 Zielzellen inkubiert und die spezifische GranzymeB Ausschüttung gemessen. Zur Messung dieser Ausschüttung wurden als Zielzellen A673 als HLA-A\*02:01-positive ES-Zelllinien genutzt. SB-KMS-KS1 diente als HLA-A\*02:01-negative ES-Zelllinie und K562 und ein Ansatz mit ausschließlich T-Zellen als Negativkontrolle. Die ES-Zelllinie A673 wurde von den T-Zellen spezifisch erkannt und führte zu der stärksten GranzymeB Ausschüttung. Die Hintergrundaktivität der T-Zellen war ausgeprägt (Abb. 11).



**Abbildung 11:** GranzymeB-Ausschüttung in Abhängigkeit vom Verhältnis von T-Zellen zu Zielzelle.

#### 4.4.7. Inhibition des Wachstums von Zielzellen durch T-Zellklon 2G12

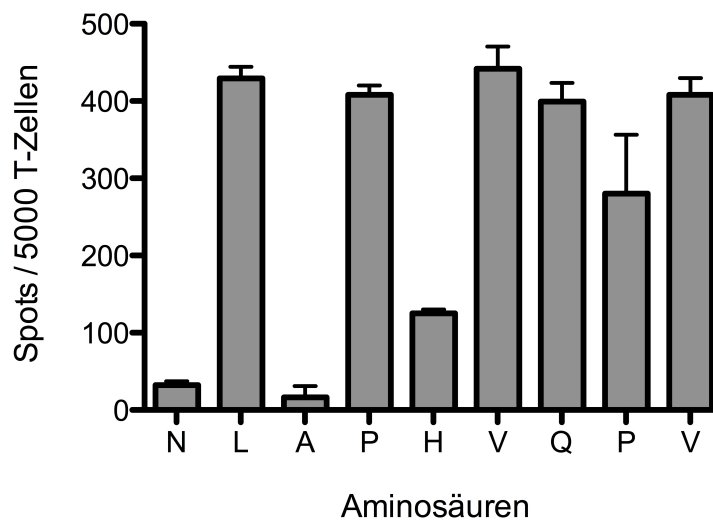
Mittels elektrischer Impedanzmessung ließ sich mit dem XCelligence System die Lyse von Tumorzellen durch den T-Zellklon 2G12 darstellen (Abb. 12). Eine vollständige Lyse der Zielzellen A673 konnte bereits in weniger als 2 Stunden erreicht werden. Die HLA-A\*02:01-negative Zelllinie SK-N-MC blieb hingegen bei unter 60% Lyse konstant. Das lytische Potential des T-Zellklons 2G12 zeigte sich somit sehr gut und spezifisch.



**Abbildung 12:** Darstellung des lytischen Potentials des T-Zellklons 2G12 im Versuch mit der Zielzelle A673 und der HLA-A\*02:01-negativen Zelllinie SK-N-MC.

#### 4.4.8. Spezifizierung einer möglichen Kreuzreaktivität mittels Alanin-Scan

Im Alanin-Scan wurden 9 Peptide auf T2-Zellen geladen und in einem ELISpot untersucht. Die Peptide (1, 3, 5), die bei Austausch einer Aminosäure von den T-Zellen nicht erkannt wurden, bestimmten das Motiv (N-X-A-X-H-X(4)) des T-Zellrezeptors. Der Alanin-Scan zur Spezifizierung einer möglichen Kreuzreaktivität des T-Zellklones erbrachte eine Übereinstimmung mit 47 Nonameren von denen 9 gute HLA-A\*02:01-Binder sind (Abb. 13). Diese wurden spezifisch erkannt und können zu einer Kreuzreaktivität des T-Zellklones führen.



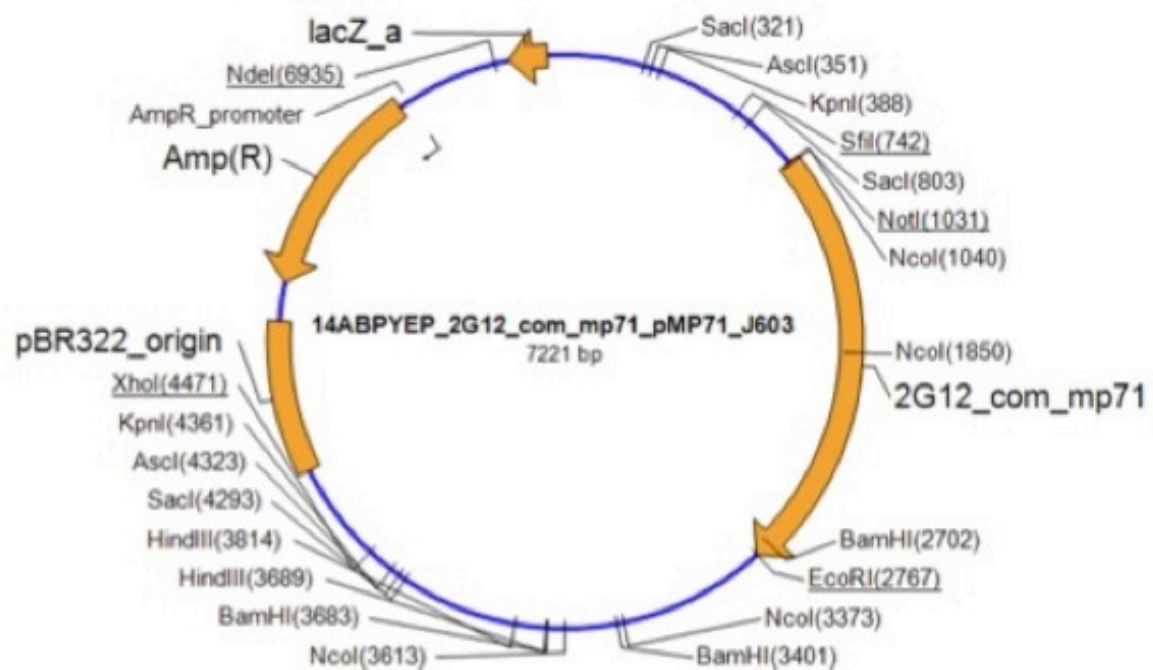
**Abbildung 13:** Darstellung des Peptid-Motivs von HOXD11<sup>50</sup> mittels Alanin-Scan.

#### **4.5. Generation transgener, antigen-spezifischer, allogener, HLA-A\*02:01 restringierter, zytotoxischer T-Zellen gerichtet gegen HOXD11**

##### **4.5.1. Erstellung eines HOXD11<sup>50</sup>2G12 T-Zellrezeptorkonstrukts als Wildtyp und in codonoptimierter und minimalmurinisierte Form**

Nach abgeschlossener Charakterisierung des Reaktionsprofils des T-Zellklons 2G12 konnten nun die ermittelten Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette mittels einem P2A-Element zu einem Rezeptorkonstrukt verbunden und von der Firma GeneArt synthetisiert werden. Hierfür wurde das Konstrukt als Wildtyp in der zunächst ermittelten Sequenz und ein weiteres Konstrukt in human-codonoptimierter und minimalmurinisierte Form erstellt. Außerdem erfolgte die Subklonierung in einen retroviralen Vektor (pMP-71) durch die Firma GeneArt. Abbildung 14 zeigt die Plasmidkarte des T-Zellkonstruktes in codonoptimierter und minimalmurinisierte Form.





**Abbildung 14:** Ansicht des durch GeneArt erstellten Konstrukts des T-Zellklons 2G12 in human-codonoptimierter und minimalmurinierter Form, in einem mp71-Vektor mit NotI und EcoRI Schnittstellen.

#### 4.5.2. Generierung von HOXD11<sup>50</sup>2G12 transgenen, zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen mit Stammzeleigenschaften (T<sub>SCM</sub>)

Zur Generation von HOXD11<sup>50</sup>2G12 transgenen T<sub>SCM</sub> wurde nach Protokoll von Cieri et al. vorgegangen (Cieri, 2013). Trotz mehrmaliger Versuche konnte keine Expression der Zellen mit dem HOXD11<sup>50</sup>2G12 erreicht werden. Versuche mit einem weiteren, nachweislich funktionierenden Rezeptor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. David Schirmer, Forschungszentrum für krebserkrankte Kinder, München) zeigten eine erfolgreiche Transduktion des Kontrollrezeptors, sodass ein Fehler im Transduktionsablauf ausgeschlossen werden konnte. Eine nachfolgende komplette Rekonstruktion der Rezeptorsequenzen mit erneuter Generierung eines Rezeptorkonstrukts ergab ebenfalls keine erfolgreiche Transduktion. Nach weiterer, kritischer Rekonstruktion möglicher Fehlerquellen, musste der Versuch ohne erfolgreiche Transduktion eingestellt werden. *In vivo* Versuche wurden, mangels erfolgloser Herstellung TCR-transgener T-Zellen unterlassen.

## 5. Diskussion

Im Jahr 2013 wurde die Immuntherapie bei Tumorerkrankungen vom *Science* Magazin als „*breakthrough of the year*“, als Durchbruch in der Tumorthherapie, deklariert (Couzin-Frankel, 2013). Während die Antikörpertherapie mittlerweile schon Einzug in Leitlinien findet und klinische Studien mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) schon vielversprechende Ergebnisse zeigen, steht die Therapie mit T-Zell-Rezeptor-modifizierten T-Zellen gerade am Anfang ihrer klinischen Erfolge (Dudley, 2008; Morgan, 2006; Reck, 2016).

Die adoptive T-Zelltherapie als Teil der Immuntherapien ermöglicht durch verschiedene Ansätze, wie z.B. die Verwendung von TIL, chimären Antigenrezeptoren oder TZR-modifizierten T-Zellen eine selektive Verstärkung der körpereigenen Immunantwort gegen die Tumorzellen. Erste Erfolge verzeichnete die adoptive T-Zelltherapie in der Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom. Bei Patienten, die refraktär in Standardtherapien waren, konnte nach Lymphodepletion und autologem Transfer von TIL in Kombination mit IL-2 Gabe eine Ansprechrate von 50-70% erreicht werden (Dudley, 2008). Ebenfalls in Patienten mit metastasierten Melanomen zeigte die Arbeitsgruppe um Morgan bei transgenen T-Zellen bereits innerhalb der ersten Monate nach Behandlungsbeginn einen deutlichen Rückgang der Tumormasse mit einem aus TIL isolierten T-Zellrezeptor (Morgan, 2006). Insgesamt lag die Ansprechrate zwar nur bei 13%; dennoch erscheint eine Therapie mit transgenen T-Zellen eine Alternative für Erkrankungen zu sein, für die eine Therapie mit TIL nicht verfügbar ist. So müssen TIL im Patienten vorhanden und isolierbar sein, um *in vitro* expandiert werden zu können. Häufig ist auch eine Identifizierung der spezifischen tumorreaktiven Zellen schwierig (Morgan, 2006). Die adoptive T-Zelltherapie konnte in den letzten Jahren zu einer Regression in verschiedenen Tumoren führen, hierzu gehören beispielsweise Melanome, Gebärmutterhalskrebs, Lymphome, Leukämie, Gallengangskrebs und das Neuroblastom (Rosenberg and Restifo, 2015). Das Ziel der adoptiven T-Zelltherapie ist es ihre therapeutischen Erfolge auf immer mehr Tumorentitäten auszuweiten, um insbesondere bei sehr aggressiven, schwer therapierbaren Tumoren, eine weitere Behandlungsoptionen darzustellen.

Das Ewing Sarkom ist hierbei in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Immuntherapie gerückt (Blaeschke, 2016; Burdach, 2000; Kirschner, 2016; Schirmer,

2016; Thiel, 2017). Die Prognose ist heute selbst bei aggressiver, multimodaler Therapie schlecht, sodass bei metastasierter Erkrankung nur eine Überlebensrate von 30% erreicht werden kann (Bernstein, 2006). Zudem haben ES-Patienten durch das zumeist sehr junge Patientenalter und die Notwendigkeit eines sehr aggressiven therapeutischen Vorgehens, besonders im Bestrahlungsfeld, ein erhöhtes Risiko für Zweitneoplasien, wie beispielsweise Osteosarkome und maligne fibröse Histiocytozytome (Fuchs, 2003; Kuttesch, 1996; Schiffman and Wright, 2011). Da es derzeit jedoch noch keine standardisierte Alternative zu einer radikalen, multimodalen Therapie gibt, ist eine Weiterentwicklung der bisherigen Forschung von entscheidender Bedeutung. Das ES bietet jedoch als wenig immunogener Tumor mit geringer Mutationsrate möglicherweise eine zu geringe Angriffsfläche für eine erfolgreiche Therapie mit TIL (Crompton, 2014; Schirmer, 2016). Viele Tumore bewirken auch eine Herunterregulation von MHC-Proteinen und können so zu einer inadäquaten Präsentation extrazellulärer Antigene führen (Fesnak, 2016). Diese Präsentation der Peptide auf der Oberfläche der Tumorzelle ist aber bei der adoptiven T-Zelltherapie der entscheidende Angriffspunkt für die T-Zelle.

Eine weitere wichtige Erkenntnis lieferten Brinkrolf und Kollegen (Brinkrolf, 2009). Sie fanden heraus, dass bei primär metastasiertem ES signifikant häufiger regulatorische T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors vorkommen als bei lokalisiertem ES. Dies führte zu der Annahme, dass es sich dabei um eine Immunevasion handelt, die eine Metastasierung begünstigt (Brinkrolf, 2009). Unter Immunevasion (englisch: *immune escape*) werden verschiedene Mechanismen zusammengefasst, die sich der Tumor zunutze macht, um vom Immunsystem unerkannt zu bleiben. Da die Funktion regulatorischer T-Zellen darin besteht, eine Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und somit periphere Toleranz zu erhalten, begünstigen sie im Tumormilieu dessen ungehindertes Wachstum. Dies führt zur Limitierung des autologen Transfers in Form unzureichend generierter Immunantworten. Bei der Therapie mit TIL, die direkt aus Tumorgewebe entnommen, *ex vivo* expandiert und reinfundiert werden, ist zudem häufig eine Isolation von Tumorgewebe in ausreichender Menge nicht möglich (Rosenberg and Dudley, 2004). Da die von Tumorgewebe exprimierte Peptide häufig auch körpereigene Peptide sind, findet im Thymus eine negative Selektion der T-Zellen statt, also eine Elimination der T-Zellen, die mit sehr hoher Affinität an diese Peptide binden. Dieser Mechanismus beugt Autoimmunreaktionen vor. So werden

Selbstantigen-spezifische T-Zellen in ihrer Anzahl stark reduziert bzw. es verbleiben nur die zytotoxischen T-Zellen mit geringer Affinität, um periphere Toleranz zu erhalten (Hogquist, 2005).

Eine Möglichkeit diesen Mechanismus zu umgehen bietet eine allogene Therapie. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Spenderlymphozyten, die im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation infundiert werden, können durch eine Transplantat-gegen-Leukämie (*Graft-versus-Leukemia*, GvL) Reaktion hochreaktiv hämatologische Erkrankungen bekämpfen (Horowitz, 1990). Diese Reaktion birgt jedoch auch das Risiko, dass sich die T-Zellen, die den GvL-Effekt generieren, im Sinne einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) auch direkt gegen den Empfänger (Wirt) richten (Horowitz, 1990; Lucas, 2008; Martinez-Laperche, 2018). Durch die Verwendung selektierter, peptid-spezifischer und allorestingierter T-Zellen kann die Gefahr einer GvHD-Reaktion minimiert werden, da sie spezifisch zunächst gut ausgewählte Antigene erkennen können. Hintergrund dieser Therapie ist, dass T-Zellen nicht zwischen Peptiden unterscheiden, die über Selbst- oder Fremd-MHC präsentiert werden. Ebenso entgehen T-Zellen eines fremden HLA-Typs der negativen Selektion und können so als hochaffine T-Zellen wirken (Thiel, 2011). Felix et al. konnten zeigen dass die T-Zellrezeptor-Peptid-MHC-Bindung bei alloreaktiven TZR ebenso wie bei autologen T-Zellen stattfindet, die Bindungsmodi also offenbar ähnlich sind (Felix and Allen, 2007). Dieser allogene Ansatz wird auch bereits für eine Therapie mit transgenen T-Zellen genutzt (Schirmer, 2016). Indem die Reaktivität von T-Zellen mittels TZR-Transfer in andere Zellen übertragen werden kann, entgehen die infundierten spezifischen T-Zellen der Selektion. Dies beschreibt einen nützlichen Ansatz, dessen potenzielle Gefahr jedoch nicht verkannt werden darf. Denn hierfür bedarf es vor allem gut ausgewählte Antigene, um diese hochaffine und hochreaktive Therapie sicher in die Klinik zu übertragen. Warum eine gute Auswahl des Antigens hierbei so entscheidend ist, zeigen letale Komplikationen in ersten klinischen Anwendungen, bei denen die infundierten T-Zellen körpereigenes Gewebe angegriffen haben. Hierbei kam es beim Einsatz von MAGE-A3/HLA-A\*02 spezifischen T-Zellen zu zwei Todesfällen durch Neurotoxizität. Weitere drei Patienten starben an kardiotoxischen Komplikationen unter Therapie mit MART-1/HLA-A\*2 oder MARGE A3/HLA-A\*01 (Kunert, 2013). Um das Risiko solcher Kreuzreaktionen kalkulierbarer zu machen, ist

eine möglichst genaue Analyse der relativen Expression des jeweiligen Antigens in Normalgewebe notwendig. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit ein Antigen ausgewählt, dessen relative Expression in Normalgewebe sehr gering ist. Die Expression sollte vor allem in den lebenswichtigen Organen gering sein, um möglichen Komplikationen wie beispielsweise Kardio- und Neurotoxizität vorzubeugen (von Heyking, 2016). Eine möglichst selektive Expression des Antigens im Tumorgewebe ist somit ausschlaggebend.

Die Identifikation der Antigene kann hierfür aus zwei Richtungen erfolgen: zum einen können tumorspezifische T-Zellen aus Patientenblut isoliert, *in vitro* mit Tumorzellen re-stimuliert und expandiert werden. Der zweite Ansatz beginnt mit einem Antigen, welches von besonderem Interesse ist, da es selektiv exprimiert oder überexprimiert in Tumorzellen einer spezifischen Entität ist (Boon and van der Bruggen, 1996; Lucas and Coulie, 2008). Für das Ewing Sarkom ist die Translokation EWS-ETS von besonderem Interesse. 85% der Ewing Sarkome gehen mit einer EWS-ETS Translokation einher, dessen Genprodukt EWS/FLI1 als Transkriptionsfaktor nachweislich die Pathogenität der Zellentwicklung induziert (Kovar, 2014). Kovar und Kollegen bestätigten, dass eine Herunterregulierung von EWS/FLI1 in ES-Zellen *in vitro* zu einem Zellzyklusarrest und Zelltod führen (Kovar, 2010; Kovar, 2014). In einem Xenograft-Modell mit Mäusen konnte hierdurch eine Reduktion der Tumorgroße beobachtet werden. EWS/FLI1 wird ausschließlich in ES-Zellen exprimiert, in Normalgewebe kommt es nicht vor. Diese Tatsache macht EWS/FLI1 zum perfekten Zielantigen für eine T-Zelltherapie. Einige Epitope konnten aus dieser Region identifiziert werden, jedoch konnte bisher kein Epitop mit ausreichend hoher Affinität zu MHC Klasse I Molekülen identifiziert werden, um eine adäquate Aktivierung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zu generieren (Evans, 2012; Uren and Toretzky, 2005). Evans und Kollegen machten zwar auch diese Beobachtung, konnten jedoch durch Austausch von Aminosäuren innerhalb der Epitope eine Verbesserung der Bindungsaffinität und somit auch der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen erreichen (Evans, 2012).

Trotzdem ist die Suche nach weiteren Antigenen essentiell. HOX-Gene sind eine Familie regulativer Gene, dessen Genprodukte Transkriptionsfaktoren sind (Gehring, 1985; von Heyking, 2016). Sie spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, sowie auch im adulten Organismus, in dem sie Funktionen wie Zellwachs-

tum, Differenzierung, Zell-Zell-Kommunikation und Kontrolle der Zellproliferation vermitteln (Cillo, 2001; Magli, 1991). HOXD11 ist physiologisch an der Ossifikation und an Formationsprozessen der Knochen beteiligt. Von Heyking und Kollegen zeigten, dass HOXD11 in ES-Zellen signifikant überexprimiert ist (von Heyking, 2016). In Microarray-Analysen konnten sie weiterhin zeigen, dass HOXD11 nur eine geringe Expression in Normalgewebe zeigt (von Heyking, 2016). Somit bietet sich HOXD11 als Antigen für eine adoptive T-Zelltherapie an und wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Nach Festlegung des zu analysierenden Antigens folgt die Suche nach einem geeigneten Peptidepitop. Die Auswahl eines Peptidepitops aus der Antigenregion wird durch eine ausreichende Immunogenität sowie durch eine adäquate Bindungsaffinität zum MHC bestimmt, um eine gute Präsentation an die T-Zelle zu erreichen. Nur so kann eine adäquate Erkennung und Aktivierung der T-Zellen erreicht werden (Lucas and Coulie, 2008). Das ausgewählte Peptid HOXD11<sup>50</sup> zeigt eine sehr gute Bindungsaffinität zu HLA-A\*02:01, dies konnte mit Hilfe von *in silico* Analysen und Bindungsassays in Vorversuchen durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Hier zeigte sich die Bindungsaffinität ebenso gut wie das gut untersuchte Influenza Peptid (GILGFVFTL) und sogar besser als andere HOXD11 Peptide.

Mittlerweile gelingt eine Isolation allo-restringierter, spezifischer T-Zellen mittels Multimer Technologie aus allogenen T-Zellpopulationen (Thiel, 2011). Spezifische T-Zellen können somit direkt mit Hilfe eines Multimeres auf das jeweilige Peptidepitop und HLA-A\*02:01 gefärbt und isoliert werden. Nach Isolation HOXD11<sup>50</sup> spezifischer HLA-A\*02:01 restringierter T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit im Kontakt mit HLA-A\*02:01-positiven ES-Zellen eine vermehrte INF- $\gamma$ -Ausschüttung detektiert und bestätigt werden. Negativ-Kontrollen führten nicht zu einer Vermehrten INF- $\gamma$ -Ausschüttung. Ebenfalls konnte eine HLA-A\*02:01 restringierte Erkennung durch die T-Zellen gezeigt werden. In einem HLA-A\*02:01 Blockierungsexperiment konnte dargestellt werden, dass HOXD11<sup>50</sup> spezifische T-Zellen ES-Zellen nur im Kontext von HLA-A\*02:01 erkennen. Eine Spezifizierung der Kreuzreaktivität zeigte ebenfalls eine Erkennung von Zellen der HLA-A\*02 Superfamilie. Eine adäquate Prozessierung und Präsentation des ausgewählten Peptidepitops konnte durch Transfektion von Cos7-Zellen mit HOXD11<sup>50</sup> cDNS, sowie HLA-A\*02:01 bestätigt werden. Aus vier T-Zelllinien wurden die Rezeptorsequenzen zweier Klone identifiziert, welche sich als

identisch herausstellten. Der T-Zellklon 2G12 mit dem besten Reaktivitäts- und Wachstumsverhalten wurde ausgewählt.

T-Zellrezeptoren zu identifizieren und in andere Zellen zu übertragen, bietet nicht nur die Möglichkeit T-Zellen vor negativer Selektion zu bewahren, sondern auch eine höhere Affinität zu gewährleisten. Die erste klinische Studie mit TZR-modifizierten T-Zellen 2006 zeigte ein Ansprechen bei 2 von 17 Patienten (Morgan, 2006). Nur sehr wenige transgene T-Zellen konnten in den Kontrollen noch detektiert werden. Zudem schien auch das Expressionslevel des transgenen TZR sehr niedrig. Eine Erklärung für die geringe Expression ist möglicherweise eine Art „Konkurrenz“ in der Expression exogener und endogener Rezeptoren, sowie eine Fehlpaarung zwischen den Ketten beider Rezeptoren (Morgan, 2006; Sommermeyer and Uckert, 2010). Sommermeyer et al. zeigten, dass manche  $\alpha/\beta$ -Kombinationen eine bessere Expression ergaben als andere (Sommermeyer, 2006). Die Sequenzierung und Generierung eines transfizierbaren Rezeptors bietet ebenfalls die Möglichkeit über Veränderungen in der Rezeptorsequenz in Form einer kompletten Murinisierung der konstanten Kette oder einer Minimalmurinisierung im konstanten und variablen Bereich eine höhere Expression und Zytokinsekretion zu erreichen und so eine signifikant stärkere Antitumorreaktion zu generieren (Cohen, 2006). Cohen und Kollegen konnten dies zeigen und führten ihre Ergebnisse auf eine durch Murinisierung vorzugsweise entstehende Paarung der konstanten Region des T-Zellrezeptors und somit weniger fehlerhafter Paarung und auf eine bessere Stabilität der CD3-Region zurück (Cohen, 2006). Um die Expression des T-Zellrezeptors in der T-Zellpopulation zu verbessern wurden in dieser Arbeit die variable und konstante Kette des T-Zellrezeptors codonoptimiert. Sommermeyer und Kollegen konnten insgesamt neun Aminosäuren identifizieren, die essentiell für eine verbesserte Expression des Rezeptors sind. Fünf dieser Aminosäuren liegen im konstanten Teil der  $\beta$ -Kette, vier liegen auf der  $\alpha$ -Kette (Sommermeyer and Uckert, 2010). Eine Expression ist nicht nur für die Aktivierung der T-Zellen von Bedeutung, sondern auch für die Differenzierung der T-Zellen in Gedächtnis- und Effektorpopulationen (Germain and Stefanova, 1999). Als Ausgangszelle für die Transfektion sind T-Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien denkbar, wobei sie unterschiedliche Charakteristiken in der klinischen Anwendung bieten.

Die Auswahl einer geeigneten T-Zellsubpopulation zur Transfektion mit dem

generierten, transgenen T-Zellrezeptor ist entscheidend. Einige klinische Studien mit Verwendung von peripheren Blutleukozyten zeigten eine beeindruckende Antitumorantwort, jedoch hat der Einsatz von peripheren Blutleukozyten auch zu schweren toxischen Reaktionen geführt (Brentjens, 2010; Morgan, 2010; Parkhurst, 2011). Eine Arbeitsgruppe um Hinrichs stellte die unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen hinsichtlich ihrer funktionellen und phänotypischen Eigenschaften gegenüber (Hinrichs, 2011). Sie zeigten, dass die Verwendung von naiven T-Zellen im Gegensatz zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen oder zentralen Gedächtnis-T-Zellen eine höhere Rezeptorexpression und robustere Proliferation aufweisen. Jedoch bieten naive T-Zellen einen entscheidenden Nachteil, da sie eine große Rolle in der Induktion einer GvHD zu spielen scheinen (Shlomchik, 2007).

Die Arbeitsgruppe Gattinoni et al. spricht sich für eine weitere T-Zellsubgruppe aus, den Gedächtnis-T-Zellen mit Stammzelleigenschaften ( $T_{SCM}$ ), welche sich entsprechend ihrer Differenzierung zwischen naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen befinden (Gattinoni, 2011). Diese  $CD45RO^-$ ,  $CCR7^+$ ,  $CD45RA^+$ ,  $CD62L^+$ ,  $CD27^+$ ,  $CD28^+$  und  $IL-7R\alpha^+$  T-Zellen zeigen eine erhöhte Proliferationskapazität und vermittelten im humanisierten Mausmodell eine stärkere Antitumorantwort im Vergleich zu bekannten Gedächtniszellen (Gattinoni, 2011). Für eine adoptive T-Zelltherapie bietet diese Zellpopulation entscheidende Vorteile, da sie großes Potential zur Selbsterneuerung bietet und sich sowohl in zentrale Gedächtniszellen, als auch in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen differenzieren können (Cieri, 2013; Gattinoni, 2011) Diese Population kann möglicherweise ebenso eine langfristige Persistenz *in vivo* gewährleisten und somit mit einem langfristigen Erhalt der Immunkompetenz entscheidende Hürden der T-Zelltherapie meistern. Zwei Wege wurden beschrieben, um  $T_{SCM}$  zu generieren: Gattinoni et al. nutzten dafür den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg (Gattinoni, 2010). Sie fanden heraus, dass dieser evolutionär hochkonservierte Signalweg nicht nur Selbsterneuerung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen induziert, sondern auch mittels Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) oder der Wnt3a eine Differenzierung zu Effektorzellen verhindert und so eine Differenzierung zu  $T_{SCM}$  induziert wird (Gattinoni, 2009). Cieri et al. induzierten eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu  $T_{SCM}$  durch Aktivierung mit anti-CD3/CD28 magnetischen Mikropartikeln und einer Kultivierung mit IL7 und IL15 (Cieri, 2013). Beide Protokolle generieren  $T_{SCM}$  mit identischem Phänotyp, jedoch ist die proliferative Kapazität bei



nach dem Protokoll von Cieri et al. generierten Zellen höher (Cieri, 2013; Schirmer, 2016). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit  $T_{SCM}$  nach dem Cieri-Protokoll generiert.

Nach Generation der  $T_{SCM}$  und retroviraler Transfektion der Zellen mit dem isolierten TZR konnte mittels Durchflusszytometrie keine Expression des TZR nachgewiesen werden. Um Fehler im Transduktionsablauf auszuschließen, wurden zwei neue Transduktionsansätze begonnen. Hierbei wurde parallel zur Transduktion mit HOXD11<sup>50</sup> spezifischem TZR ein Ansatz mit einem zuvor erfolgreich eingebrachten TZR unternommen. Auch in diesem Ansatz konnte der HOXD11<sup>50</sup> spezifische TZR nicht in die Zellen eingebracht werden. Im Kontrollansatz konnte jedoch eine gute Expression erzielt werden. Ein Fehler im Transduktionsablauf sowie der verwendeten Materialien konnte somit ausgeschlossen werden. Als weitere mögliche Fehlerquelle konnte durch Austausch des HOXD 11<sup>50</sup> Multimeres eine ineffektive Anfärbung für die durchflusszytometrische Messung ausgeschlossen werden. Nachdem nun eine fehlerhafte Transduktion und Anfärbung ausgeschlossen werden konnte, wurde die Rezeptorsequenz in der Arbeitsgruppe von Beginn an nochmals identifiziert. Hierfür wurde zunächst aus der T-Zellkultur der Klone 2G12 RNS gewonnen und cDNS synthetisiert. Anschließend konnten mittels PCR zur Ermittlung der  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette die auch zuvor ermittelten Sequenzen V $\alpha$  1.1 und V $\beta$ 8 bestätigt werden. Die *in silico* Analyse zur Komplettierung der Rezeptorketten wurde erneut mit der Datenbank IMGT durchgeführt. Die dort ermittelte Sequenz deckte sich mit den zuvor ermittelten Sequenzen. Lediglich eine Abweichung der Nukleotidsequenz im Signalpeptid der  $\alpha$ -Kette konnte ermittelt werden. Eine Analyse der Sequenz ergab für beide ermittelte Sequenzen ein offenes Leseraster, die ermittelte Sequenzabweichung hat weiterhin keine Änderung der Aminosäuresequenz ergeben. Da somit eine fehlerfreie Prozessierung und Faltung des Peptides gewährleistet war, sollte diese Abweichung nicht zu einer gestörten Expression des Rezeptors führen. Dennoch wurde ein Rezeptorkonstrukt mit der neu ermittelten Sequenz erstellt und eine erneute Transduktion unternommen. Eine Expression des Rezeptors konnte auch mit diesem Rezeptorkonstrukt nicht nachgewiesen werden. Somit verbleibt es unklar, warum es nicht gelang, den TZR in die Zelle zu transferieren. Auch in der Literatur lassen sich keine Lösungsansätze finden.

## 6. Zusammenfassung

Die therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit Ewing Sarkom sind trotz multimodaler Therapie begrenzt. Die Überlebensrate bei Patienten mit metastasiertem ES liegt derzeit nur bei unter 30%. Patienten mit Rezidiv haben eine noch schlechtere Prognose. Das frühe Erkrankungsalter und die Notwendigkeit einer aggressiven Therapie erhöhen außerdem das Risiko für Zweitneoplasien. Neue Therapieansätze sind also dringend erforderlich. Unterschiedliche Therapieansätze der Immunonkologie wurden in den letzten Jahren hervorgebracht, in dessen Mittelpunkt eine Induktion des Immunsystems zur Bekämpfung des Tumors steht. Zytotoxische T-Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte ein. Für eine adoptive T-Zelltherapie mit zytotoxischen T-Zellen konnten für das ES unterschiedliche, tumorassoziierte Antigene identifiziert werden. Dazu gehört das in dieser Studie verwendete Antigen HOXD11. Dieses ist in ES-Zellen überexprimiert, zeigt jedoch in Normalgewebe nur eine geringe Expression. Die Auswahl eines geeigneten Peptidpitops setzt eine Analyse bezüglich ausreichender Immunogenität, sowie starker Bindungsaffinität zu HLA-A\*02 voraus. Für die vorliegende Arbeit konnten allo-restringierte, peptidspezifische T-Lymphozyten, gerichtet gegen das Antigen HOXD11 *in vitro* hinsichtlich ihres Reaktionsprofils charakterisiert werden. In ELISpot Assays wurde die INF- $\gamma$  Ausschüttung im Kontakt mit HOXD11 exprimierenden Tumorzellen, sowie mit Tumorzellen ohne HOXD11 Expression überprüft. Die Alloreaktivität der T-Zellklone konnte durch die Erkennung HOXD11 exprimierender, HLA-A\*02:01-positiver Zellen bestätigt werden. HLA-A\*02:01-negative Zellen wurden nicht erkannt. Eine HLA-A\*02:01 restringierte Erkennung konnte auch in einem Blockierungsexperiment bestätigt werden. HOXD11<sup>50</sup> spezifische T-Zellen zeigen eine signifikant bessere Erkennung von Tumorzellen im Kontext von HLA-A\*02:01. Ein Alanin-Scan gab Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktivität der T-Zellen. Unter dem ermittelten Motiv konnten neun Peptide mit ebenfalls guter HLA-A\*02:01 Bindung eruiert werden. Eine Expression solcher Peptide kann jedoch möglicherweise zu Kreuzreaktivitäten führen und sollte vor dem Einsatz mit transgenen T-Zellen im Patienten genau spezifiziert werden. Die Transfektion mit dem generierten Rezeptor blieb in dieser Studie erfolglos. Nach Ausschluss möglicher Fehlerquellen bleibt unklar, warum der Rezeptor in den T-Zellen nicht exprimiert werden konnte.

## 7. Literaturverzeichnis

Antonescu, C.R., Tschernyavsky, S.J., Woodruff, J.M., Jungbluth, A.A., Brennan, M.F., Ladanyi, M. (2002). Molecular diagnosis of clear cell sarcoma: detection of EWS-ATF1 and MITF-M transcripts and histopathological and ultrastructural analysis of 12 cases. *J Mol Diagn*, 4(1), 44-52

Apiou, F., Flagiello, D., Cillo, C., Malfoy, B., Poupon, M.F., Dutrillaux, B. (1996). Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet*, 73(1-2), 114-115

Arvand, A., Denny, C.T. (2001). Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene*, 20(40), 5747-5754

Barbee, M.S., Ogunniyi, A., Horvat, T.Z., Dang, T.O. (2015). Current status and future directions of the immune checkpoint inhibitors ipilimumab, pembrolizumab, and nivolumab in oncology. *Ann Pharmacother*, 49(8), 907-937

Bendle, G.M., Linnemann, C., Hooijkaas, A.I., Bies, L., de Witte, M.A., Jorritsma, A., Kaiser, A.D., Pouw, N., Debets, R., Kieback, E., Uckert, W., Song, J.Y., Haanen, J.B., Schumacher, T.N. (2010). Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med*, 16(5), 565-570, 561p following 570

Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R.L., Schuck, A., Teot, L.A., Juergens, H. (2006). Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist*, 11(5), 503-519

Biswas, B., Bakhshi, S. (2016). Management of Ewing sarcoma family of tumors: Current scenario and unmet need. *World J Orthop*, 7(9), 527-538

Blaeschke, F., Thiel, U., Kirschner, A., Thiede, M., Rubio, R.A., Schirmer, D., Kirchner, T., Richter, G.H.S., Mall, S., Klar, R., Riddell, S., Busch, D.H., Krackhardt, A., Grunewald, T.G., Burdach, S. (2016). Human HLA-A\*02:01/CHM1+ allo-restricted T cell receptor transgenic CD8+ T cells specifically inhibit Ewing sarcoma growth in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 7(28), 43267-43280

Boardman, D., Maher, J., Lechler, R., Smyth, L., Lombardi, G. (2016). Antigen-specificity using chimeric antigen receptors: the future of regulatory T-cell therapy? *Biochem Soc Trans*, 44(2), 342-348

Boon, T., van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*, 183(3), 725-729

Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I., Sadelain, M. (2010). Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*, 18(4), 666-668

Brinkrolf, P., Landmeier, S., Altvater, B., Chen, C., Pscherer, S., Rosemann, A., Ranft, A., Dirksen, U., Juergens, H., Rossig, C. (2009). A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype (CD4+CD25hiFoxP3+) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease. *Int J Cancer*, 125(4), 879-886

Brzostek, J., Gascoigne, N.R.J. (2017). Thymic Origins of T Cell Receptor Alloreactivity. *Transplantation*, 101(7), 1535-1541

Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M.S., Muller-Tidow, C., Richter, G.H. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle*, 8(13), 1991-1996

Burdach, S., van Kaick, B., Laws, H.J., Ahrens, S., Haase, R., Korholz, D., Pape, H., Dunst, J., Kahn, T., Willers, R., Engel, B., Dirksen, U., Kramm, C., Nurnberger, W., Heyll, A., Ladenstein, R., Gadner, H., Jurgens, H., Goel, U. (2000). Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Dusseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol*, 11(11), 1451-1462

Cho, C., Perales, M.A. (2016). Rapid identification of cytokine release syndrome after haploidentical PBSC transplantation and successful therapy with tocilizumab. *Bone Marrow Transplant*, 51(12), 1620-1621

Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Lupo-Stanghellini, M.T., Mavilio, F., Mondino, A., Biciato, S., Recchia, A., Bonini, C. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*, 121(4), 573-584

Cieri, N., Mastaglio, S., Oliveira, G., Casucci, M., Bondanza, A., Bonini, C. (2014). Adoptive immunotherapy with genetically modified lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation. *Immunol Rev*, 257(1), 165-180

Cillo, C. (1994). HOX genes in human cancers. *Invasion Metastasis*, 14(1-6), 38-49

Cillo, C., Cantile, M., Faiella, A., Boncinelli, E. (2001). Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol*, 188(2), 161-169

Clay, T.M., Custer, M.C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S.A., Nishimura, M.I. (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol*, 163(1), 507-513

Cohen, C.J., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S.A., Morgan, R.A. (2006). 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*, 66(17), 8878-8886

Cole, D.K., Miles, K.M., Madura, F., Holland, C.J., Schauenburg, A.J., Godkin, A.J., Bulek, A.M., Fuller, A., Akpovwa, H.J., Pymm, P.G., Liddy, N., Sami, M., Li, Y., Rizkallah, P.J., Jakobsen, B.K., Sewell, A.K. (2014). T-cell receptor (TCR)-peptide specificity overrides affinity-enhancing TCR-major histocompatibility complex interactions. *J Biol Chem*, 289(2), 628-638

Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 342(6165), 1432-1433

Crompton, B.D., Stewart, C., Taylor-Weiner, A., Alexe, G., Kurek, K.C., Calicchio, M.L., Kiezun, A., Carter, S.L., Shukla, S.A., Mehta, S.S., Thorner, A.R., de Torres, C., Lavarino, C., Sunol, M., McKenna, A., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Lawrence, M.S., Stojanov, P., Rosenberg, M., Ambrogio, L., Auclair, D., Seepo, S., Blumenstiel, B., DeFelice, M., Imaz-Rosshandler, I., Schwarz-Cruz, Y.C.A., Rivera, M.N., Rodriguez-Galindo, C., Fleming, M.D., Golub, T.R., Getz, G., Mora, J., Stegmaier, K. (2014). The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov*, 4(11), 1326-1341

de Aquino, M.T., Malhotra, A., Mishra, M.K., Shanker, A. (2015). Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. *Immunol Lett*, 166(2), 117-133

Delattre, O., Zucman, J., Melot, T., Garau, X.S., Zucker, J.M., Lenoir, G.M., Ambros, P.F., Sheer, D., Turc-Carel, C., Triche, T.J., et al. (1994). The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*, 331(5), 294-299

Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., et al. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*, 359(6391), 162-165

Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H., Steinmetz, M. (1986). Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 320(6059), 232-238

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8(8), 793-800

Downing, J.R., Head, D.R., Parham, D.M., Douglass, E.C., Hulshof, M.G., Link, M.P., Motroni, T.A., Grier, H.E., Curcio-Brint, A.M., Shapiro, D.N. (1993). Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 143(5), 1294-1300

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., Wunderlich, J., Restifo, N.P., Thomasian, A., Downey, S.G., Smith, F.O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D.E., Rosenberg, S.A. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol*, 26(32), 5233-5239

Eshhar, Z., Waks, T., Bendavid, A., Schindler, D.G. (2001). Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J Immunol Methods*, 248(1-2), 67-76

Evans, C.H., Liu, F., Porter, R.M., O'Sullivan, R.P., Merghoub, T., Lunsford, E.P., Robichaud, K., Van Valen, F., Lessnick, S.L., Gebhardt, M.C., Wells, J.W. (2012). EWS-FLI-1-targeted cytotoxic T-cell killing of multiple tumor types belonging to the Ewing sarcoma family of tumors. *Clin Cancer Res*, 18(19), 5341-5351

Ewing, J. (1972). Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin*, 22(2), 95-98

Felgenhauer, J.L., Nieder, M.L., Krailo, M.D., Bernstein, M.L., Henry, D.W., Malkin, D., Baruchel, S., Chuba, P.J., Sailer, S.L., Brown, K., Ranganathan, S., Marina, N. (2013). A pilot study of low-dose anti-angiogenic chemotherapy in combination with standard multiagent chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic Ewing sarcoma family of tumors: A Children's Oncology Group (COG) Phase II study NCT00061893. *Pediatr Blood Cancer*, 60(3), 409-414

Felix, N.J., Allen, P.M. (2007). Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol*, 7(12), 942-953

Fesnak, A.D., June, C.H., Levine, B.L. (2016). Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 16(9), 566-581

Fuchs, B., Valenzuela, R.G., Inwards, C., Sim, F.H., Rock, M.G. (2003). Complications in long-term survivors of Ewing sarcoma. *Cancer*, 98(12), 2687-2692

Gattinoni, L., Ji, Y., Restifo, N.P. (2010). Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 16(19), 4695-4701

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D.C., Price, D.A., June, C.H., Marincola, F.M., Roederer, M., Restifo, N.P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 17(10), 1290-1297

Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., Paulos, C.M., Muranski, P., Restifo, N.P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nat Med*, 15(7), 808-813

Gehring, W.J. (1985). Homeotic genes, the homeo box, and the genetic control of development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50(243-251)

Germain, R.N., Stefanova, I. (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol*, 17(467-522)

Giavridis, T., van der Stegen, S.J.C., Eyquem, J., Hamieh, M., Piersigilli, A., Sadelain, M. (2018). CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*, 24(6), 731-738

Grier, H.E., Krailo, M.D., Tarbell, N.J., Link, M.P., Fryer, C.J., Pritchard, D.J., Gebhardt, M.C., Dickman, P.S., Perlman, E.J., Meyers, P.A., Donaldson, S.S., Moore, S., Rausen, A.R., Vietti, T.J., Miser, J.S. (2003). Addition of ifosfamide and



etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med*, 348(8), 694-701

Grunewald, T.G., Diebold, I., Esposito, I., Plehm, S., Hauer, K., Thiel, U., da Silva-Buttkus, P., Neff, F., Unland, R., Muller-Tidow, C., Zobywalski, C., Lohrig, K., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Prazeres da Costa, O., Gorch, A., Cossarizza, A., Butt, E., Richter, G.H., Burdach, S. (2012). STEAP1 is associated with the invasive and oxidative stress phenotype of Ewing tumors. *Mol Cancer Res*, 10(1), 52-65

Haanen, J.B., Robert, C. (2015). Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog Tumor Res*, 42(55-66)

Hahm, K.B. (1999). Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet*, 23(4), 481

Han, X., Wang, Y., Han, W.D. (2018). Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment. *Chronic Dis Transl Med*, 4(4), 225-243

Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W.R., Huang, J., Klebanoff, C.A., Johnson, L.A., Kerkar, S.P., Yang, S., Muranski, P., Palmer, D.C., Scott, C.D., Morgan, R.A., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. (2011). Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*, 117(3), 808-814

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urban, W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723

Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 5(10), 772-782

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., et al. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75(3), 555-562

Hude, I., Sasse, S., Engert, A., Brockelmann, P.J. (2017). The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma. *Haematologica*, 102(1), 30-42

Intlekofer, A.M., Thompson, C.B. (2013). At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 94(1), 25-39

Juergens, C., Weston, C., Lewis, I., Whelan, J., Paulussen, M., Oberlin, O., Michon, J., Zoubek, A., Juergens, H., Craft, A. (2006). Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer*, 47(1), 22-29

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26(677-704

Khoury, J.D. (2005). Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol*, 12(4), 212-220

Kirschner, A., Thiede, M., Blaeschke, F., Richter, G.H., Gerke, J.S., Baldauf, M.C., Grunewald, T.G., Busch, D.H., Burdach, S., Thiel, U. (2016). Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 predicts fratricide amongst T cell receptor transgenic CD8+ T cells directed against tumor-associated antigens. *Oncotarget*, 7(35), 56584-56597

Kovar, H. (2010). Downstream EWS/FLI1 - upstream Ewing's sarcoma. *Genome Med*, 2(1), 8

Kovar, H. (2014). Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 18(11), 1315-1328

Kunert, A., Straetemans, T., Govers, C., Lamers, C., Mathijssen, R., Sleijfer, S., Debets, R. (2013). TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors: Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. *Front Immunol*, 4(363)

Kuttesch, J.F., Jr., Wexler, L.H., Marcus, R.B., Fairclough, D., Weaver-McClure, L., White, M., Mao, L., Delaney, T.F., Pratt, C.B., Horowitz, M.E., Kun, L.E. (1996). Second malignancies after Ewing's sarcoma: radiation dose-dependency of secondary sarcomas. *J Clin Oncol*, 14(10), 2818-2825

Laurence, V., Pierga, J.Y., Barthier, S., Babinet, A., Alapetite, C., Palangie, T., de Pinieux, G., Anract, P., Pouillart, P. (2005). Long-term follow up of high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue in adults with Ewing tumor. *Am J Clin Oncol*, 28(3), 301-309

Lin, P.P., Wang, Y., Lozano, G. (2011). Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma*, 2011(

Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., Binder-Scholl, G.K., Smethurst, D.P., Gerry, A.B., Pumphrey, N.J., Bennett, A.D., Brewer, J.E., Dukes, J., Harper, J., Tayton-Martin, H.K., Jakobsen, B.K., Hassan, N.J., Kalos, M., June, C.H. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*, 122(6), 863-871

Lucas, K.G., Schwartz, C., Kaplan, J. (2008). Allogeneic stem cell transplantation in a patient with relapsed Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 51(1), 142-144

Lucas, S., Coulie, P.G. (2008). About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin Immunol*, 20(5), 301-307

Magli, M.C., Barba, P., Celetti, A., De Vita, G., Cillo, C., Boncinelli, E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(14), 6348-6352

Martinez-Laperche, C., Buces, E., Aguilera-Morillo, M.C., Picornell, A., Gonzalez-Rivera, M., Lillo, R., Santos, N., Martin-Antonio, B., Guillem, V., Nieto, J.B., Gonzalez, M., de la Camara, R., Brunet, S., Jimenez-Velasco, A., Espigado, I., Vallejo, C., Sampol, A., Bellon, J.M., Serrano, D., Kwon, M., Gayoso, J., Balsalobre, P., Urbano-Izpizua, A., Solano, C., Gallardo, D., Diez-Martin, J.L., Romo, J., Buno, I., Transplantation, G.V.I.C.o.t.S.G.f.H. (2018). A novel predictive approach for GVHD after allogeneic SCT based on clinical variables and cytokine gene polymorphisms. *Blood Adv*, 2(14), 1719-1737

Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., Mahnke, Y.D., Melenhorst, J.J., Rheingold, S.R., Shen, A., Teachey, D.T., Levine, B.L., June, C.H., Porter, D.L., Grupp, S.A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371(16), 1507-1517

Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K.L., Martin, P.L., Nemecek, E.R., Yanik, G.A., Peters, C., Baruchel, A., Boissel, N., Mechinaud, F., Balduzzi, A., Krueger, J., June, C.H., Levine, B.L., Wood, P., Taran, T., Leung, M., Mueller, K.T., Zhang, Y., Sen, K., Lebwohl, D., Pulsipher, M.A., Grupp, S.A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378(5), 439-448

Maus, M.V., Grupp, S.A., Porter, D.L., June, C.H. (2014). Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, 123(17), 2625-2635

Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhai, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., Campana, D., Riley, J.L., Grupp, S.A., June, C.H. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*, 17(8), 1453-1464

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A.,

de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A., Rosenberg, S.A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314(5796), 126-129

Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., Rosenberg, S.A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 18(4), 843-851

Ordonez, J.L., Osuna, D., Herrero, D., de Alava, E., Madoz-Gurpide, J. (2009). Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res*, 69(18), 7140-7150

Parkhurst, M.R., Yang, J.C., Langan, R.C., Dudley, M.E., Nathan, D.A., Feldman, S.A., Davis, J.L., Morgan, R.A., Merino, M.J., Sherry, R.M., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Phan, G.Q., Lim, R.M., Wank, S.A., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Laurencot, C.M., Rosenberg, S.A. (2011). T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*, 19(3), 620-626

Patnaik, S., Yarlagadda, J., Susarla, R. (2018). Imaging features of Ewing's sarcoma: Special reference to uncommon features and rare sites of presentation. *J Cancer Res Ther*, 14(5), 1014-1022

Porter, D.L., Hwang, W.T., Frey, N.V., Lacey, S.F., Shaw, P.A., Loren, A.W., Bagg, A., Marcucci, K.T., Shen, A., Gonzalez, V., Ambrose, D., Grupp, S.A., Chew, A., Zheng, Z., Milone, M.C., Levine, B.L., Melenhorst, J.J., June, C.H. (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 7(303), 303ra139

Potratz, J., Dirksen, U., Jurgens, H., Craft, A. (2012). Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr Hematol Oncol*, 29(1), 1-11

Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P., Delattre, O. (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7275-7283

Reck, M., Rodriguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Czoszi, T., Fulop, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M.A., Lubiniecki, G.M., Shentu, Y., Rangwala, R., Brahmer, J.R., Investigators, K.-. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 375(19), 1823-1833

Redini, F., Heymann, D. (2015). Bone Tumor Environment as a Potential Therapeutic Target in Ewing Sarcoma. *Front Oncol*, 5(279)

Richter, G.H., Fasan, A., Hauer, K., Grunewald, T.G., Berns, C., Rossler, S., Naumann, I., Staeger, M.S., Fulda, S., Esposito, I., Burdach, S. (2013). G-Protein coupled receptor 64 promotes invasiveness and metastasis in Ewing sarcomas through PGF and MMP1. *J Pathol*, 230(1), 70-81

Richter, G.H., Plehm, S., Fasan, A., Rossler, S., Unland, R., Bennani-Baiti, I.M., Hotfilder, M., Lowel, D., von Luetlichau, I., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Kovar, H., Staeger, M.S., Muller-Tidow, C., Burdach, S. (2009). EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuroectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13), 5324-5329

Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257(5067), 238-241

Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M.L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*, 65(24), 11459-11468

Riggi, N., Stamenkovic, I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett*, 254(1), 1-10

Robbins, P.F., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Nahvi, A.V., Helman, L.J., Mackall, C.L., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Restifo, N.P., Raffeld, M., Lee, C.C., Levy, C.L., Li, Y.F., El-Gamil, M., Schwarz, S.L., Laurencot, C., Rosenberg, S.A. (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*, 29(7), 917-924

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.F., Testori, A., Grob, J.J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W.H., Jr., Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T.T., Humphrey, R., Hoos, A., Wolchok, J.D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364(26), 2517-2526

Rosenberg, S.A., Dudley, M.E. (2004). Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 Suppl 2(14639-14645

Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*, 319(25), 1676-1680

Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230), 62-68

Ross, K.A., Smyth, N.A., Murawski, C.D., Kennedy, J.G. (2013). The biology of ewing sarcoma. *ISRN Oncol*, 2013(759725

Schiffman, J.D., Wright, J. (2011). Ewing's Sarcoma and Second Malignancies. *Sarcoma*, 2011(736841

Schirmer, D., Grunewald, T.G., Klar, R., Schmidt, O., Wohlleber, D., Rubio, R.A., Uckert, W., Thiel, U., Bohne, F., Busch, D.H., Krackhardt, A.M., Burdach, S., Richter, G.H. (2016). Transgenic antigen-specific, HLA-A\*02:01-allo-restricted cytotoxic T cells recognize tumor-associated target antigen STEAP1 with high specificity. *Oncoimmunology*, 5(6), e1175795

Scholten, K.B., Kramer, D., Kueter, E.W., Graf, M., Schoedl, T., Meijer, C.J., Schreurs, M.W., Hooijberg, E. (2006). Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol*, 119(2), 135-145

Schwentner, R., Papamarkou, T., Kauer, M.O., Stathopoulos, V., Yang, F., Bilke, S., Meltzer, P.S., Girolami, M., Kovar, H. (2015). EWS-FLI1 employs an E2F switch to drive target gene expression. *Nucleic Acids Res*, 43(5), 2780-2789

Shlomchik, W.D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 340-352

Sommermeier, D., Neudorfer, J., Weinhold, M., Leisegang, M., Engels, B., Noessner, E., Heemskerk, M.H., Charo, J., Schendel, D.J., Blankenstein, T., Bernhard, H., Uckert, W. (2006). Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol*, 36(11), 3052-3059

Sommermeier, D., Uckert, W. (2010). Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol*, 184(11), 6223-6231

Staege, M.S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U.E., Hansen, G., Afar, D., Burdach, S.E. (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res*, 64(22), 8213-8221

Suh, C.H., Ordonez, N.G., Hicks, J., Mackay, B. (2002). Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastruct Pathol*, 26(2), 67-76



Svane, I.M., Verdegaal, E.M. (2014). Achievements and challenges of adoptive T cell therapy with tumor-infiltrating or blood-derived lymphocytes for metastatic melanoma: what is needed to achieve standard of care? *Cancer Immunol Immunother*, 63(10), 1081-1091

Svingen, T., Tonissen, K.F. (2006). Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity (Edinb)*, 97(2), 88-96

Svoboda, L.K., Harris, A., Bailey, N.J., Schwentner, R., Tomazou, E., von Levetzow, C., Magnuson, B., Ljungman, M., Kovar, H., Lawlor, E.R. (2014). Overexpression of HOX genes is prevalent in Ewing sarcoma and is associated with altered epigenetic regulation of developmental transcription programs. *Epigenetics*, 9(12), 1613-1625

Tang, X.Y., Sun, Y., Zhang, A., Hu, G.L., Cao, W., Wang, D.H., Zhang, B., Chen, H. (2016). Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*, 6(12), e013904

Thiel, U., Pirson, S., Muller-Spahn, C., Conrad, H., Busch, D.H., Bernhard, H., Burdach, S., Richter, G.H. (2011). Specific recognition and inhibition of Ewing tumour growth by antigen-specific allo-restricted cytotoxic T cells. *Br J Cancer*, 104(6), 948-956

Thiel, U., Schober, S.J., Einspieler, I., Kirschner, A., Thiede, M., Schirmer, D., Gall, K., Blaeschke, F., Schmidt, O., Jabar, S., Ranft, A., Alba Rubio, R., Dirksen, U., Grunewald, T.G.P., Sorensen, P.H., Richter, G.H.S., von Luttichau, I.T., Busch, D.H., Burdach, S.E.G. (2017). Ewing sarcoma partial regression without GvHD by chondromodulin-I/HLA-A\*02:01-specific allorestricted T cell receptor transgenic T cells. *Oncoimmunology*, 6(5), e1312239

Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., Delattre, O. (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*, 11(5), 421-429

Uren, A., Toretsky, J.A. (2005). Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol*, 1(4), 521-528

Uttenthal, B.J., Chua, I., Morris, E.C., Stauss, H.J. (2012). Challenges in T cell receptor gene therapy. *J Gene Med*, 14(6), 386-399

van Maldegem, A.M., Bhosale, A., Gelderblom, H.J., Hogendoorn, P.C., Hassan, A.B. (2012). Comprehensive analysis of published phase I/II clinical trials between 1990-2010 in osteosarcoma and Ewing sarcoma confirms limited outcomes and need for translational investment. *Clin Sarcoma Res*, 2(1), 5

von Heyking, K., Roth, L., Ertl, M., Schmidt, O., Calzada-Wack, J., Neff, F., Lawlor, E.R., Burdach, S., Richter, G.H. (2016). The posterior HOXD locus: Its contribution to phenotype and malignancy of Ewing sarcoma. *Oncotarget*, 7(27), 41767-41780

Voss, S.D. (2018). Staging and following common pediatric malignancies: MRI versus CT versus functional imaging. *Pediatr Radiol*, 48(9), 1324-1336

Wherry, E.J., Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 486-499

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Stefan Burdach und PD Dr. Günther Richter für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie die stetige Unterstützung im Verlauf dieses Projektes.

PD Dr. Günther Richter für seine immer offene Tür, die sehr konstruktiven und lehrreichen Gespräche und die tolle Art diese Arbeitsgruppe zu leiten.

Dr. David Schirmer für die gute Begleitung, die vielen Stunden der Einarbeitung, die Geduld und die hilfreichen Gespräche bei jeglichen Schwierigkeiten.

Allen meinen tollen Kollegen im Forschungszentrum für krebskranke Kinder, für das gute Miteinander, die gegenseitige Unterstützung und Hilfe sowie einfach für eine sehr schöne und lustige Zeit.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester Hilke für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung dabei meine Träume zu verwirklichen!

Und zu guter Letzt danke ich Markus für sein Vertrauen in mich, seine nie endende Unterstützung, manche motivierenden Worte und den ein oder anderen Schups in die richtige Richtung. Ohne dich wäre vieles anders, einiges wäre nicht möglich, aber vor allem wäre wohl alles weniger schön! Danke!