

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Analyse der Wirkung eines HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptors gegen die alpha-Kette  
des GM-CSF-Rezeptors (CSF2RA) auf hämatopoetische Stammzellen mittels eines  
Koloniebildungstests**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Viktoria Hauptert  
aus Neunkirchen

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
<b>1 Einleitung und Ziel der Dissertation .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Die Entstehung von Malignomen.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Die Rolle des Immunsystems in der Krebsentstehung.....</b>	<b>3</b>
2.2.1 Der Krebs-Immunitätszyklus .....	3
2.2.2 Immunüberwachung und <i>Immunediting</i> .....	4
2.2.2.1 Die drei Phasen des Immuneditings - <i>Elimination, Equilibrium</i> und <i>Escape</i> .....	5
<b>2.3 Die Vielfalt humaner T-Zellen.....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Konventionelle T-Zellen .....	7
2.3.2 Unkonventionelle T-Zellen .....	9
2.3.3 HLA-unabhängige $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren im Melanommodell Ma-Mel-86.....	9
<b>2.4 Der GM-CSF-Rezeptor und CSF2RA.....</b>	<b>10</b>
2.4.1 Der strukturelle Aufbau des GM-CSF-Rezeptors .....	10
2.4.2 Die menschliche Hämatopoese und CSF2RA.....	11
2.4.2.1 Charakteristika hämatopoetischer Stammzellen .....	11
2.4.2.2 CSF2RA und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen .....	12
2.4.3 Die Funktionen des GM-CSF-Rezeptors sowie von CSF2RA und GM-CSF im Rahmen maligner und nicht-maligner Erkrankungen.....	14
<b>2.5 GM-CSF und CSF2RA im Kontext aktueller Therapien .....</b>	<b>15</b>
2.5.1 GM-CSF versus monoklonale Antikörper gegen CSF2RA bei Covid-19-Patienten.....	15
2.5.2 Möglichkeiten der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen und CSF2RA als Target .....	15
2.5.2.1 CAR-T-Zellen.....	17
2.5.2.2 TCR-T-Zellen, TCR-like CARs und TCR-CARs .....	19
2.5.2.3 HLA-unabhängige $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren .....	20
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Geräte .....	21
3.1.2 Plastik- und Glaswaren, Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.3 Reagenzien und Chemikalien .....	22
3.1.4 Antibiotika.....	23
3.1.5 Rekombinante Zytokine .....	23
3.1.6 Enzyme .....	23
3.1.7 Antikörper .....	23
3.1.8 MicroBeads .....	24
3.1.9 Lösungen und Puffer .....	24
3.1.10 Vektoren und Plasmide.....	25

3.1.11	Zellen und Zelllinien.....	25
3.1.11.1	NOMO-1.....	25
3.1.11.2	K562.....	25
3.1.11.3	Ma-Mel-86b.....	25
3.1.11.4	Phoenix-AMPHO.....	26
3.1.11.5	Leukapheresatproben.....	26
3.1.12	Zellkulturmedien.....	26
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.2.1	Zellkultur.....	28
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität.....	28
3.2.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	28
3.2.4	Isolation humaner peripherer Blutlymphozyten aus den Leukapheresatproben.....	29
3.2.5	Isolation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus den Leukapheresatproben.....	29
3.2.6	Retrovirale Transduktion humaner Zellen.....	30
3.2.6.1	Transduktion humaner T-Zellen mit anti-CSF2RA und anti-TRP2 T-Zell-Rezeptor-Konstrukten.....	30
3.2.6.2	Transduktion der CML-Zelllinie K-562_CD80.83-KO <sup>B2M/CIIITA</sup> mit humanem CSF2RA.....	31
3.2.7	Durchflusszytometrie.....	31
3.2.8	IFN-γ-ELISpot-Assay.....	32
3.2.9	Antikörperblockade der T-Zellen.....	32
3.2.10	CD107a-Degranulations-Assay.....	33
3.2.11	Koloniebildungstest.....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines experimentelles Prozedere.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Spender 1.....</b>	<b>38</b>
4.2.1	Durchflusszytometrische Analyse der CSF2RA- und CD34-Expression verschiedener hämatopoetischer Zellen des Spenders 1.....	38
4.2.2	Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren.....	41
4.2.3	Isolation der CD34 <sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1.....	42
4.2.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der CSF2RA-Expression auf den Targets NOMO-1, K562_KO und K562_KO/CSF2RA.....	43
4.2.5	Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34 <sup>+</sup> Zellen durch cTCR-αCSF2RA-transduzierte T-Zellen des Spenders 1.....	44
4.2.6	CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR-αCSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 1 durch Co-Inkubation mit autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	46
4.2.7	Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR-αCSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 1 gegenüber autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	49
<b>4.3</b>	<b>Spender 2.....</b>	<b>53</b>

4.3.1	Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 2 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren und Isolation transgener CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	53
4.3.2	Isolation der CD34 <sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 2 .....	54
4.3.3	Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34 <sup>+</sup> Zellen durch cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2 .....	55
4.3.4	CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2 durch Co-Inkubation mit autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	58
4.3.5	Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 2 gegenüber autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	60
<b>4.4</b>	<b>Spender 3 .....</b>	<b>62</b>
4.4.1	Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 3 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren.....	62
4.4.2	Isolation der CD34 <sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 3 .....	64
4.4.3	Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34 <sup>+</sup> Zellen durch cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen des Spenders 3.....	64
4.4.4	CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 3 durch Co-Inkubation mit autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	65
4.4.5	Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 3 gegenüber autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Die experimentelle Vorgehensweise in dieser Arbeit.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Nachweis der CSF2RA-Expression auf hämatopoetischen Zellen.....</b>	<b>70</b>
5.2.1	Die CSF2RA-Expression reifer Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten .	70
5.2.2	Die CSF2RA-Expression CD34 <sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen .....	71
<b>5.3</b>	<b>Die Analyse der zytotoxischen Wirkung der cTCR-<math>\alpha</math>CSF2RA-transduzierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 1 auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen .....</b>	<b>72</b>
<b>5.4</b>	<b>Die gesonderte Analyse der zytotoxischen Wirkung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> cTCR-<math>\alpha</math>CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 2 auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen.....</b>	<b>73</b>
<b>5.5</b>	<b>Die Analyse der zytotoxischen Wirkung der cTCR-<math>\alpha</math>CSF2RA-transduzierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 3 im Koloniebildungstest.....</b>	<b>76</b>
<b>5.6</b>	<b>Die Alloreaktivität der endogenen T-Zell-Rezeptoren .....</b>	<b>77</b>
<b>5.7</b>	<b>Stimulation der analysierten T-Zellen mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle für die maximale Degranulationsfähigkeit.....</b>	<b>77</b>
<b>5.8</b>	<b>Die Zytotoxizität der cTCR-<math>\alpha</math>CSF2RA-transduzierten T-Zellen gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.....</b>	<b>78</b>
<b>5.9</b>	<b>Mögliche unerwünschte Nebenwirkungen cTCR-<math>\alpha</math>CSF2RA-transduzierter T-Zellen bei der Anwendung in künftigen Immuntherapien .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>94</b>
<b>8.1</b>	<b>Schematische Darstellung der cTCR-Expressionskonstrukte .....</b>	<b>94</b>

<b>8.2 Die Vektorkarten der retroviralen Vektoren pMX_IRES_Puro_Dest#35 und pMX_IRES_NEO_Dest#9.....</b>	<b>95</b>
<b>8.3 Abbildungen der durchflusszytometrischen Analysen der CD107a-Degranulations-Assays .....</b>	<b>96</b>
8.3.1 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1.....	96
8.3.2 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 2.....	101
8.3.3 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 3.....	104

## Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
AP-1	Acivator Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BCMA	B-cell maturation antigen
BFU-E	Burst-Forming Unit Erythroid
BTN3A1	Butyrophilin 3A1
CADM1	Cell Adhesion Molecule 1
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CDR	Complementary Determining Region
CFU-E	Colony-Forming Unit Erythroid
CFU-GEMM	Colony-Forming Unit Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM	Colony-Forming Unit Granulocyte, Macrophage
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
Covid-19	Coronavirus disease 2019
CRS	Cytokine Release Syndrome
CRTAM	Class I-Restricted T cell Associated Molecule
CSF2RA	GM-CSF-Receptor alpha chain
CSF2RB	GM-CSF-Receptor beta chain
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
cTCR	chimärisierter T-Zellrezeptor
DC	dentritische Zelle
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
dt.	deutsch, deutsch
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFRt	truncated Epidermal Growth Factor Receptor
ELISpot	enzyme linked immuno spot
engl.	englisch
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FMO	Fluorescence Minus One
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gp100	Glykoprotein 100
GvHD	Graft versus Host Disease
HFE	High Fe
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HVS-tk	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
iCasp9	inducible safety switch caspase 9
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
iNKT-Zellen	invariant Natural Killer T cells
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
JAK2	Januskinase 2
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
LAMP-1	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
mAB	monoclonal Antibody
MAGE	Melanoma Antigen
MAIT-Zellen	Mucosa-Associated Invariant T cells
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

MCL	Mantle cell lymphoma
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Multiples Myelom
MPP	Multipotent Progenitors
mTRAC	murine T-cell receptor alpha chain constant region
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NKG2D	Natural Killer Group 2 D
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NY-ESO-1	New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1
PAP	Pulmonary alveolar proteinosis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SCF	stem cell factor, Stem Cell Factor
scFv	Single chain variable fragment
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF-α	Tumor Necrose Factor alpha
TRAC	T-cell receptor alpha chain constant domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAJ	T-cell receptor alpha chain junction region
TRAV	T-cell receptor alpha chain variable region
TRBC	T-cell receptor beta chain constant domain
TRBD	T-cell receptor beta chain diversity region
TRBJ	T-cell receptor beta chain junction region
TRBV	T-cell receptor beta chain variable region
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRP2	Tyrosinase-Related Protein 2
TRUCK	T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZAP-70	Zeta-Associated-Protein 70
β <sub>2</sub> M	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hallmarks of Cancer. ....	3
Abbildung 2: Die Entwicklung der antitumoralen Immunantwort. ....	4
Abbildung 3: Krebs-Immunediting. ....	7
Abbildung 4: Der $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor. ....	8
Abbildung 5: Die molekulare Zusammensetzung des GM-CSF-Rezeptors. ....	11
Abbildung 6: Die menschliche Hämatopoese. ....	13
Abbildung 7: Möglichkeiten des adoptiven T-Zell-Transfers. ....	16
Abbildung 8: Die verschiedenen Generationen der CARs. ....	18
Abbildung 9: Allgemeines experimentelles Prozedere. ....	36
Abbildung 10: Die CD107a-Expression der cTCR-transgenen Zellen nach sechs- und nach 24-stündiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets im Degranulations-Assay. ....	37
Abbildung 11: Die CD34/CSF2RA-Oberflächenexpression der Leukapheresat-Zellen des Spenders 1. ....	39
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Identifizierung der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1. ....	40
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-Oberflächenexpression der Leukapheresat-Zellen des Spenders 1. ....	41
Abbildung 14: Aufreinigung CD34 <sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1. ....	42
Abbildung 15: CSF2RA-Expression der AML-Zelllinie NOMO-1. ....	43
Abbildung 16: CSF2RA-Expression der stabil mit CSF2RA transduzierten Zelllinie K562_KO. ....	44
Abbildung 17: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen des Spenders 1. ....	45
Abbildung 18: Erläuterung der Gating-Strategie zur Auswertung aller CD107a-Degranulations-Assays anhand der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 1. ....	47
Abbildung 19: Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 1. ....	48
Abbildung 20: Kolonie-bildende Einheiten verschiedener Differenzierungsstufen aus CD34 <sup>+</sup> Zellen im Koloniebildungstest des Spenders 1. ....	50
Abbildung 21: Koloniebildungstest zur Beurteilung der Morphologie von Kolonien der AML-Zelllinie NOMO-1 und der CML-Zelllinie K562_KO. ....	51
Abbildung 22: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierender T-Zellen des Spenders 1. ....	52
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-Oberflächenexpression der isolierten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2. ....	54
Abbildung 24: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2. ....	56
Abbildung 25: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2. ....	57
Abbildung 26: Degranulations-Assay mit CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 2. ....	59
Abbildung 27: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierender CD4- und CD8-positiver T-Zellen des Spenders 2 gegenüber autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen. ....	61
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR-, CD4- und CD8-Oberflächenexpression der T-Zellen des Spenders 3. ....	63
Abbildung 29: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen des Spenders 3. ....	65
Abbildung 30: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 3. ....	66
Abbildung 31: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR- $\alpha$ CSF2RA- oder cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierter T-Zellen des Spenders 3. ....	68

Abbildung 32: Schematische Darstellung des Expressionsprodukts der cTCRs gegen CSF2RA und TRP2.....	94
Abbildung 33: Vektorkarte des retroviralen Vektors pMX_IRES_Puro_Dest#35/pMX_IRES_Neo_Dest#9.....	95
Abbildung 34: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen ohne Targets.....	96
Abbildung 35: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Inkubation mit PMA/Ionomycin.....	97
Abbildung 36: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit autologen CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	98
Abbildung 37: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit NOMO-1 und K562_KO/CSF2RA.....	99
Abbildung 38: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit K562_KO und Ma-Mel-86b_KO/TRP2.....	100
Abbildung 39: CD107a-Degranulations-Assay mit CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2.....	101
Abbildung 40: CD107a-Degranulations-Assay mit CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2.....	102
Abbildung 41: CD107a-Degranulations-Assay mit CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 2.....	103
Abbildung 42: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 3.....	104
Abbildung 43: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 3.....	105

## 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Seit vielen Jahren beschäftigt sich die Arbeitsgruppe Wölfel im Rahmen verschiedener Forschungsprojekte mit der Identifizierung möglicher Zielantigene für T-Zell-vermittelte Immuntherapien. Dabei wurden in einer Vielzahl von Modellen, in erster Linie von Patienten mit Malignem Melanom, die Zielantigene verschiedener MHC-restringierter tumor-spezifischer T-Zellen entdeckt und charakterisiert. Im Modell der Melanompantin Ma-Mel-86 wurden jedoch auch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen gefunden, die sowohl HLA-positive als auch HLA-defiziente autologe Tumorzelllinien erkennen. Es zeigte sich, dass diese T-Zellen in der Lage sind, die Tumorzellen HLA-unabhängig zu erkennen. Die HLA-negativen Melanomzelllinien Ma-Mel-86b und -86f waren aus verschiedenen Metastasen generiert worden, die in vivo durch unabhängig aufgetretene, biallelische Mutationen der für  $\beta$ 2-Mikroglobulin kodierenden Gene (B2M) keine MHC-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche trugen. Fehlende oder stark herunterregulierte HLA-Expression maligner Zellen ist ein häufig zu beobachtender Immunevasionsmechanismus bei malignen Erkrankungen und führt zur Wirkungslosigkeit immuntherapeutischer Strategien, die auf HLA-abhängige, tumorreaktive T-Zellen setzen<sup>1</sup>. Durch die Verwendung von T-Zellen, die tumor-assoziierte Antigene (TAA) unabhängig von der HLA-Expression der Tumorzellen erkennen, könnte deshalb das Spektrum bereits existierender Immuntherapien erweitert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass einige der HLA-unabhängigen, tumorreaktiven T-Zellen der Patientin Ma-Mel-86 die  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors (CSF2RA) erkennen. Der CSF2RA-spezifische T-Zell-Rezeptor (TCR) wurde aus den T-Zellen der Patientin kloniert und anschließend in ein bicistronisches retrovirales Konstrukt überführt, das sich zur effizienten Transduktion humaner T-Zellen eignet. Aktuell ist der CSF2RA-reaktive, HLA-unabhängige TCR Gegenstand präklinischer Experimente.

CSF2RA, die Untereinheit des Rezeptors für GM-CSF (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), findet sich nicht nur auf Zellen der normalen Myelopoese, sondern auch auf den Blasten akuter myeloischer Leukämien (AML) und auch bei einer Vielzahl solider Tumoren, insbesondere auf malignen Melanomen<sup>2</sup>. Die Ergebnisse verschiedener Publikationen deuten darauf hin, dass eine erhöhte CSF2RA-Expression den malignen Phänotyp durch eine Verbesserung der Glucoseaufnahme begünstigen kann<sup>3</sup>. Weiter korrelierte eine erhöhte CSF2RA-Expression direkt mit einer verringerten Apoptoserate<sup>4</sup>. Aufgrund dieser Funktionen stellt CSF2RA grundsätzlich ein attraktives Zielmolekül für Tumor-Immuntherapien dar. Da der GM-CSF-Rezeptor natürlicherweise auf der Oberfläche reifer und unreifer myelopoetischer Zellen exprimiert wird<sup>5</sup>, muss jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die CSF2RA-adressierende Tumor-Immuntherapie mit CSF2RA-spezifischen und HLA-unabhängigen T-Zellen nicht in einer Eliminierung gesunder hämatopoetischer Zellen resultiert.

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde die HLA-unabhängige Erkennung von Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen durch den anti-CSF2RA-TCR in Interferon-gamma-ELISpot (engl. *Enzyme Linked Immuno Spot*) -Assays bestätigt<sup>6</sup>. Eine Erkennung CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Leukapheresaten war bislang in einigen wenigen Experimenten nicht nachweisbar. Daraus ließ sich jedoch keine sichere Aussage über eine mögliche Beeinträchtigung der Hämatopoese ableiten. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung des anti-CSF2RA-TCR auf die Proliferation und Differenzierung CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen dreier Stammzellspender in einem Methylcellulose-basierten Koloniebildungstest zu untersuchen.

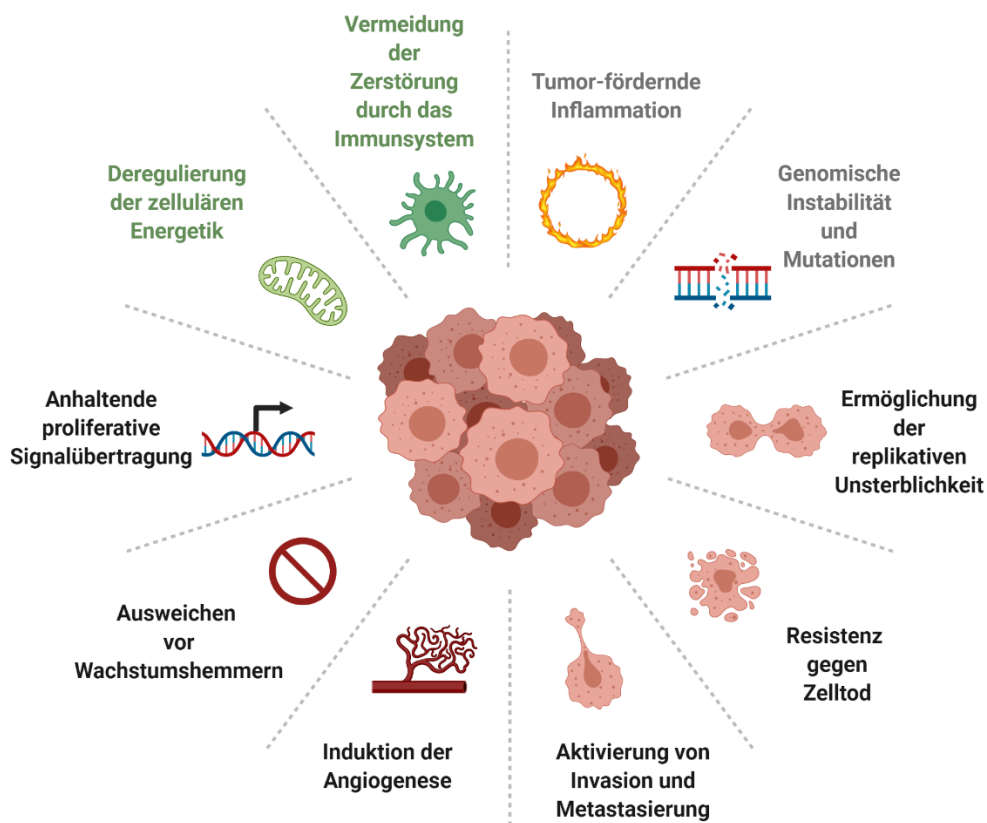
## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Die Entstehung von Malignomen

Krebs zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit<sup>7</sup> und stellt in Europa nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar<sup>8</sup>. In Deutschland war beinahe jeder vierte Todesfall im Jahr 2019 auf eine Krebserkrankung zurückzuführen<sup>9</sup>. Aus diesem Grund ist das Forschungsfeld, welches sich mit der Entwicklung neuer oder der Optimierung bereits bestehender Anti-Tumortherapien beschäftigt, einer der am rasantesten wachsenden Forschungsbereiche überhaupt.

Krebs ist eine genetische Erkrankung, für deren Entstehung durchschnittlich drei bis sieben Mutationen in wichtigen regulatorischen Genen auftreten müssen<sup>10</sup>. Diese können beispielsweise durch Karzinogene, Strahlung, virale Infektionen, chronische Entzündungen oder erbliche genetische Veränderungen hervorgerufen werden<sup>1</sup>. Eine wichtige Rolle für die maligne Transformation von gesunden Zellen spielen einerseits Tumor-Suppressor-Gene und andererseits Onkogene beziehungsweise Proto-Onkogene. In ihrer physiologischen Form regulieren sie das Zellwachstum und die Zellvermehrung<sup>11</sup>. Kommt es zu inaktivierenden Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen, kann dies unmittelbar zu einer reduzierten Kontrolle des Zellwachstums und der -vermehrung (engl. *loss of function*) führen, während mutierte Onkogene in der Regel eine Funktionsverstärkung erfahren und somit fördernd auf die Tumorentstehung wirken können (engl. *gain of function*)<sup>12</sup>.

Die maligne Entartung einer Zelle kann als mehrstufiger Prozess beschrieben werden. Aufgrund vielfältiger Mutationen erlangt die Zelle bestimmte Fähigkeiten, die sie von einer nicht-malignen, physiologischen Zelle unterscheiden<sup>10</sup>. Mutationen, die für die Entartung von gesunden Körperzellen verantwortlich und unabdingbar mit einem Wachstumsvorteil für Tumorzellen verbunden sind, nennt man Treiber-Mutationen. Zur Erlangung dieser Fähigkeiten bedarf es gewisser Grundvoraussetzungen wie der genomischen Instabilität oder tumorfördernder Inflammation<sup>1</sup> (**Abb. 1**). Hanahan und Weinberg veröffentlichten erstmals im Jahr 2000 eine Zusammenfassung verschiedener Eigenschaften, die eine Krebszelle von einer nicht entarteten Körperzelle unterscheiden und auf verschiedenste Tumorentitäten übertragbar sind. Jedoch variiert tumorspezifisch die Abfolge des Erwerbs dieser Fähigkeiten. Die ursprünglich beschriebenen „*Hallmarks of Cancer*“<sup>13</sup> (dt. Schlüsselmerkmale des Krebses) umfassen die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, uneingeschränkte Replikation, Vermeidung der Apoptose, Induktion der Angiogenese sowie die Fähigkeit zur Invasion verschiedener Gewebe und Metastasierung<sup>13</sup>. Diese sechs Schlüsselmerkmale einer Krebszelle wurden 2011 um die Veränderung des Zellmetabolismus und Mechanismen der Immunevasion erweitert<sup>1</sup>.



**Abbildung 1: Hallmarks of Cancer.** Tumorzellen zeichnen sich durch charakteristische Eigenschaften aus, welche auch als „Hallmarks of Cancer“ bezeichnet werden. Zu den sechs ursprünglichen Charaktereigenschaften (schwarz beschriftet) wurden zwei weitere hinzugefügt (grün beschriftet) und zusätzlich die Grundvoraussetzungen für malignes Wachstum beschrieben (grün beschriftet). Angelehnt an Hanahan und Weinberg, 2011<sup>1</sup>, adaptiert aus „Hallmarks of Cancer“, BioRender.com (2021), abgerufen über <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

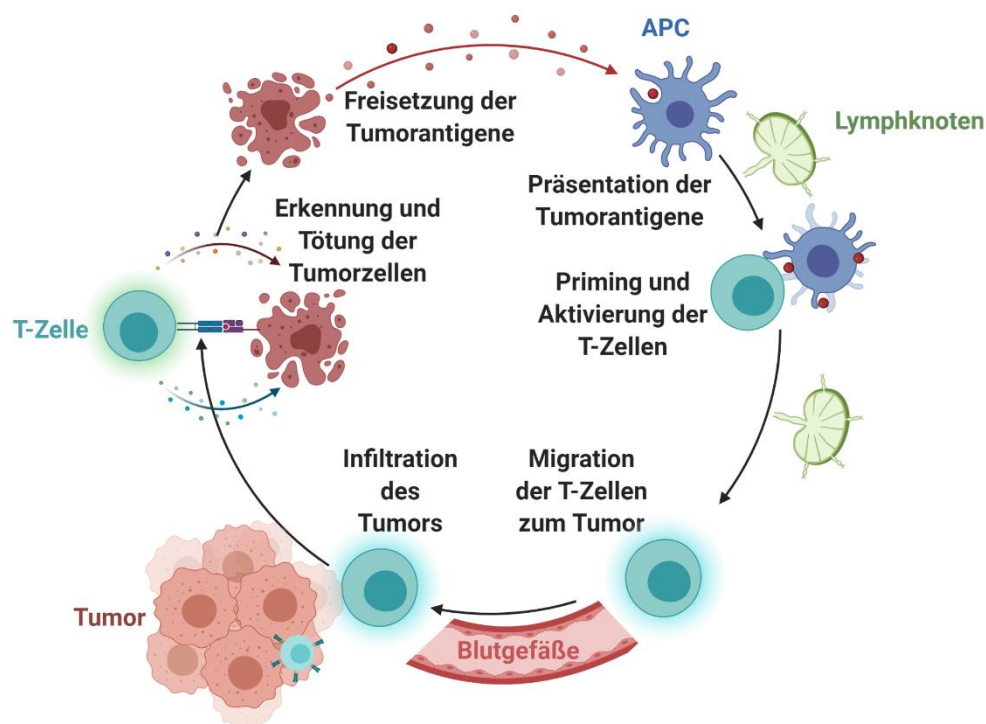
## 2.2 Die Rolle des Immunsystems in der Krebsentstehung

Die Prävalenz der malignen Neoplasien steigt mit dem Lebensalter<sup>14</sup>, während die Funktionsfähigkeit sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems bei älteren Menschen sinkt<sup>15</sup>. Dieser Prozess wird als Immunseneszenz bezeichnet<sup>15</sup> und legt nahe, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Malignomen spielt<sup>16</sup>.

### 2.2.1 Der Krebs-Immunitätszyklus

2013 haben Chen und Mellman die Entwicklung einer antitumoralen Immunantwort als zyklischen, aus sieben Schritten bestehenden Mechanismus beschrieben, der seither als „Cancer-Immunity Cycle“ (dt. Krebsimmunityzyklus) bekannt ist<sup>17</sup>. Der Krebsimmunityzyklus beginnt mit der Freisetzung tumorassoziierter Antigene (TAA), die von dendritischen Zellen (DC, engl. *Dendritic Cell*) prozessiert und über MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*, dt. Haupthistokompatibilitätskomplex) -Moleküle in Form kurzer Peptide an der Zelloberfläche präsentiert werden. Anschließend infiltrieren T-Lymphozyten, die durch die spezifische Erkennung der präsentierten TAA-Peptide aktiviert worden sind, das Tumorgewebe und zerstören die Tumorzellen. Die Identifizierung maligner Zellen gelingt durch die spezifische Bindung der auf der Zelloberfläche der T-Zellen exprimierten T-Zell-Rezeptoren an die Peptid (p)-MHC-Komplexe. Durch die Zerstörung der malignen Zellen werden wiederum vermehrt TAA freigesetzt und der Zyklus setzt sich weiter fort<sup>17</sup>. Ebenfalls beteiligt an der Etablierung einer antitumoralen Immunantwort sind das Komplementsystem<sup>18</sup> und weitere Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems<sup>19</sup>. Jedoch verläuft der Krebsimmunityzyklus

nicht ohne Einschränkungen, da maligne Zellen sich im Verlauf der Erkrankung verändern, indem sie beispielsweise an Immunogenität verlieren und sich aufgrund dessen der spezifischen Erkennung und der darauffolgenden Zerstörung durch das Immunsystem entziehen können (2.2.2.1)<sup>20</sup>. An jedem Schritt des Krebsimmunzyklus sind einerseits verschiedene, die antitumorale Immunantwort stimulierende Lymphokine wie IL (Interleukin) - 2, IL-12 oder IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma) beteiligt. IL-2 und IL-12 wirken fördernd auf das T-Zell-Priming und ihre Aktivierung, IFN- $\gamma$  auf die Zerstörung der Krebszellen. Andererseits existieren gleichzeitig diverse, die Anti-Tumor-Antwort inhibierende Faktoren wie VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), IL-10 oder PD-1 (engl. *Programmed Cell Death Protein 1*) /PD-L1 (engl. *Programmed Death Ligand 1*) -Interaktionen. VEGF hemmt unter anderem die Infiltration von Tumoren durch T-Zellen, während IL-10 die Antigenpräsentation beeinträchtigt. Über die Bindung von PD-1 der zytotoxischen T-Zellen an seinen Liganden PD-L1 auf Tumorzellen kann die T-Zell-Aktivierung und damit letztlich auch die Zerstörung von Tumorzellen unterbunden werden<sup>17</sup>.



**Abbildung 2: Die Entwicklung der antitumoralen Immunantwort.** Die antitumorale Wirkung des Immunsystems bedarf eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Immunzellen innerhalb unterschiedlicher Gewebe, die durch die Zerstörung von malignen Zellen gemeinsam an der Tumorunterdrückung beteiligt sind. Die Freisetzung von Tumorantigenen stellt dabei den ersten Schritt des Krebsimmunzyklus dar. APC primen und aktivieren durch Präsentation der Tumorantigene naive T-Zellen in Lymphknoten. Die aktivierten T-Zellen migrieren über Blutgefäße zum Tumor und infiltrieren diesen. Die malignen Zellen werden aufgrund ihrer Tumorantigenpräsentation über MHC-Klasse I-Moleküle von zytotoxischen T-Zellen erkannt und zerstört. Ihre Zerstörung resultiert wiederum in der Freisetzung von Tumorantigenen und der Zyklus setzt sich weiter fort. APC: Antigen-präsentierende Zellen. Angelehnt an Chen und Mellman, 2013<sup>17</sup>, adaptiert aus „Tumor-Specific T Cell Induction and Function“, BioRender.com (2021), abgerufen über <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

## 2.2.2 Immunüberwachung und Immunediting

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass das Immunsystem die Krebsentstehung überwacht (engl. *cancer immunosurveillance*) und unterdrückt. Zum Beispiel weisen immunsupprimierte Empfänger transplantierte Organe höhere Krebsinzidenzen auf als immunkompetente Menschen ähnlichen Alters<sup>21</sup>. Die dieser Beobachtung zugrunde liegende Theorie der *cancer immunosurveillance* wurde bereits vor über 60 Jahren von Burnet und Thomas aufgestellt<sup>22</sup>. Allerdings hat sich inzwischen die Ansicht etabliert, dass die

Suppression der Tumorentstehung nur eine von multiplen, zum Teil gegensätzlichen, Funktionen des Immunsystems darstellt<sup>23</sup>. Denn neben verschiedenen Mechanismen mit antitumorale Wirkung kann das Immunsystem z.B. durch chronische Inflammation die Krebsentstehung fördern<sup>24</sup>.

#### 2.2.2.1 Die drei Phasen des Immuneditings - *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape*

Die gegensätzlichen Wirkungen des Immunsystems auf die Krebsentstehung wurden von Dunn und Schreiber als Weiterentwicklung der Hypothese der *cancer immunosurveillance* unter dem Begriff *cancer immunoediting* (dt. Krebs-Immunediting) zusammengefasst. Das Immunediting umfasst drei Phasen: *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape* (dt. Flucht)<sup>25</sup>.

In der ersten Phase des Immuneditings, der *Elimination*, die im engeren Sinn der *cancer immunosurveillance* entspricht, wird die antitumorale Immunantwort mithilfe des angeborenen und adaptiven Immunsystems induziert<sup>25</sup>. Tumorzellen exprimieren TAA und TSA (Tumor-spezifische Antigene), die mittels MHC-Klasse I-Molekülen direkt auf der Zelloberfläche präsentiert werden, oder NKG2D (*engl. Natural Killer Group 2 D*) -Liganden, die direkt von CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder NK (Natürliche Killer) -Zellen erkannt werden können<sup>23</sup>. Neben T-Lymphozyten sind auch dendritische Zellen maßgeblich an der antitumoralen Immunantwort beteiligt, indem sie Tumorantigene aufnehmen, präsentieren und damit T- und schließlich auch B-Zellen aktivieren<sup>26</sup>. T-Zellen und NK-Zellen setzen das proinflammatorische Lymphokin IFN- $\gamma$  frei, welches den Zellzyklus und die Angiogenese in Tumorzellen hemmt<sup>23</sup> und ihre Immunogenität über eine verstärkte MHC-Klasse I-Expression steigert<sup>25</sup>. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die als eine der zentralen Komponenten der antitumoralen Immunantwort angesehen werden, induzieren über Fas- und TRAIL (*engl. Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) apoptotische Prozesse in Tumorzellen. Des Weiteren können sie maligne Zellen mittels Freisetzung von Perforin und Granzym lysieren. Auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Granulozyten sind an der Eliminierung transformierter Zellen beteiligt. Dies wird ebenfalls vor allem durch die Sekretion proinflammatorischer Botenstoffe, wie z.B. TNF- $\alpha$  (*engl. Tumor Necrose Factor-alpha*), IL-1 und IL-12, vermittelt<sup>23</sup>. Gelingt die vollständige Eradikation der Tumorzellen, entfallen die folgenden Phasen des Immuneditings.

In den meisten Fällen jedoch treten diejenigen Tumorzellen, die der *Elimination* durch das Immunsystem entkommen sind, in die mitunter mehrere Jahre andauernde Phase des *Equilibrium* ein<sup>25</sup>. Das *Equilibrium* ist ein dynamischer Prozess zwischen dem adaptiven Immunsystem und malignen Zellen, in dem das Immunsystem es schafft, die Proliferation der überlebenden Krebszellen einzudämmen. Einerseits befindet sich ein Teil der malignen Zellen in einer Art funktionellem Ruhezustand (*engl. tumor dormancy*), der durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, IL-12 und IFN- $\gamma$  aufrechterhalten wird<sup>1</sup>. Andererseits entstehen in dieser Phase des Immuneditings aufgrund des ständigen Selektionsdrucks mutierte, gegen die Mechanismen des Immunsystems resistenter und weniger immunogene Tumorzellen<sup>25</sup>. Anstelle der Progression der Krebserkrankung kann auch diese Phase bereits den finalen Punkt des Immuneditings darstellen, sodass die Tumorerkrankung lebenslang klinisch nicht in Erscheinung tritt<sup>19</sup>.

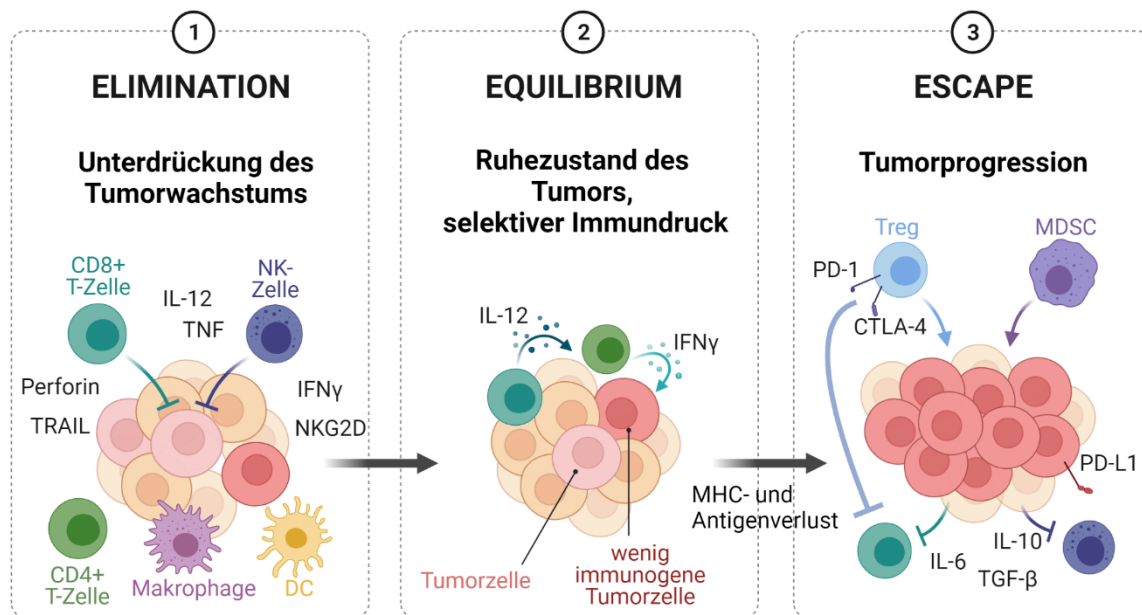
Die finale Phase des Immuneditings, *immunoescape* (dt. Immunflucht), ist durch die wiedereinsetzende Proliferation der Tumorzellen gekennzeichnet. Diese kann teilweise durch den stetig aufrecht erhaltenen Immundruck erklärt werden, der schlussendlich in mutierten malignen Zellen resultiert, die vom Immunsystem des Patienten nicht länger erkannt oder eliminiert werden können<sup>25</sup>. Darüber hinaus wird das Umgehen der Immunsystem-vermittelten Zerstörung von Tumorzellen durch eine Vielzahl von Alterationen im Tumormikromilieu, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem betreffen, ermöglicht<sup>18</sup>.

Damit eine Tumorprogression möglich ist, bedürfen die entarteten Zellen einer hohen Menge an Energie und der ständigen Verfügbarkeit von Nährstoffen<sup>27</sup>. Um diesen erhöhten Bedarf an Ressourcen decken zu können, entziehen Tumoren allen umgebenden Immun- und gesunden Körperzellen essenzielle Nährstoffe, schwächen sie und somit deren potenziell antitumorale Wirkung<sup>27</sup>. Beispielsweise führt ein Mangel an Tryptophan zu einer verminderten Proliferation von T-Zellen, während ein Glukosemangel die zytotoxische Funktion der T-Zellen einschränkt<sup>27</sup>. Tumorzellen besitzen außerdem die Fähigkeit, lokal eine immunsuppressive Tumorumgebung (engl. *tumor microenvironment*) zu schaffen<sup>1</sup>. Sie sezernieren Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  (engl. *Transforming Growth Factor beta*) sowie Chemokine, welche die Funktion und Vermehrung dendritischer Zellen, NK-Zellen sowie zytotoxischer T-Zellen inhibieren<sup>28</sup> und gleichzeitig die Rekrutierung und Expansion CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen (Tregs) fördern<sup>29</sup>.

Regulatorische T-Zellen wiederum exprimieren sogenannte Immun-Checkpoint-Proteine wie CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und PD-1 auf ihrer Zelloberfläche<sup>23</sup>, die normalerweise zur Inaktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf deren Zellmembran exprimiert werden<sup>26</sup>. Interagiert CTLA-4, welches auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, mit den auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimierten Molekülen B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), führt dies zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung, da CD28 auf T-Zellen nicht länger an CD80 und CD86 binden und ein co-stimulatorisches Signal erzeugen kann<sup>30</sup>. Auch die Bindung von PD-1 auf zytotoxischen T-Zellen an seinen unter anderem auf Tumorzellen exprimierten Liganden PD-L1 beeinflusst die Funktion zytotoxischer T-Zellen durch Abschwächung der TCR-Signalwege negativ<sup>26</sup>. Zusätzlich erfolgt eine indirekte Hemmung der T-Zell-Aktivität über die Bindung von PD-L1 an B7-1 auf APC<sup>31</sup>. Tumorzellen können neben der Möglichkeit der direkten T-Zell-Inhibition auch M2-Makrophagen und MDSCs (engl. *Myeloid-derived suppressor cells*) aktivieren, die ihrerseits wiederum die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten hemmen<sup>28</sup>.

Eine weitere Form der *immunoescape* stellt die Vermeidung der Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem dar<sup>25</sup>. Dies gelingt dem Tumor unter anderem durch einen Verlust der Tumorantigen- oder der MHC-Klasse I-Expression, welche weder notwendig für das Tumorüberleben noch für das Tumorstadium sind<sup>26</sup>. Für die Erkennung von Antigenen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedarf es jedoch der durch HLA Klasse I vermittelten Antigenpräsentation tumorassoziierter Peptidantigene<sup>32</sup>. Gleichzeitig stellen MHC-negative Zellen Ziele für NK-Zellen dar<sup>29</sup>. MHC-Klasse I-Proteine bestehen aus einer schweren und einer leichten Kette. Die schwere Kette umfasst drei Domänen ( $\alpha_1$ -  $\alpha_3$ ) und ist in der Zellmembran verankert, wohingegen die leichte Kette aus einer löslichen Untereinheit, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2M$ ), gebildet wird<sup>32</sup>. Sowohl die fehlende Tumorantigen-Expression als auch der HLA-Klasse I-Verlust führen dazu, dass die Tumorzellen nicht mehr durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden können und die Tumorprogression so nicht länger kontrolliert werden kann<sup>23</sup>. CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen jedoch eine zentrale Rolle in der Tumorelimination. Dies verdeutlichen Studien, die zeigen, dass die Prognose von Krebspatienten positiv beeinflusst wird, wenn CD8<sup>+</sup> tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) innerhalb des Tumors angereichert sind<sup>26</sup>. Das Vorkommen tumorinfiltrierender Lymphozyten korreliert jedoch mit der Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen<sup>33</sup>. Veränderungen in der HLA-Expression kann mit bis zu 90% in einem Großteil unterschiedlicher Tumorentitäten nachgewiesen werden. Die Alterationen reichen vom Verlust einzelner Allele bis zum vollständigen Verlust von HLA-Klasse I-Molekülen<sup>25</sup>. Weiter besteht eine negative Korrelation zwischen der fehlenden Expression von HLA-Klasse I-Molekülen und dem Ansprechen des Tumors auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren gegen CTLA-4, PD-1 und PD-L1<sup>34,35</sup>.





**Abbildung 3: Krebs-Immuneediting.** Das Immunsystem nimmt im Laufe einer Krebserkrankung eine duale Rolle ein: Zu Beginn steht die Tumor-supprimierende Wirkung, vermittelt durch Zytokine oder Rezeptor-Liganden-Interaktionen (schwarz) zwischen Zellen des angeborenen (Makrophagen, NK-Zellen) sowie des adaptiven Immunsystems (T-Zellen) und Tumorzellen, im Vordergrund. Dies ist die Phase der Elimination. Der anhaltende Selektionsdruck durch das adaptive Immunsystem, unter anderem durch die Sekretion von IL-12 und IFN- $\gamma$  vermittelt, in der Phase des Equilibriums fördert die Entstehung nur noch schwach immunogener Tumorzellen, die sich dann in der Phase der Escape der Erkennung des Immunsystems über PD-L1-Expression oder Sekretion immunsupprimierender Faktoren wie IL-6, IL-10 oder TGF- $\beta$  entziehen und gleichzeitig immunsupprimierende Zellen wie Tregs oder MDSCs rekrutieren können. Als Folge davon kommt es zur Tumorprogression. IL: Interleukin; TNF: Tumor Nekrose Faktor; IFN: Interferon; DC: Dendritische Zelle; TRAIL: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand; NKG2D: Natural Killer Group 2D; MHC: Major Histocompatibility Complex; Treg: regulatorische T-Zelle; MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell; PD-(L)1: Programmed Cell Death Protein 1 (Ligand); CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4; TGF: Transforming Growth Factor. Angelehnt an Dunn und Schreiber, 2004<sup>25</sup>, adaptiert aus „Cancer Immunoediting“, BioRender.com (2021), abgerufen über <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

## 2.3 Die Vielfalt humaner T-Zellen

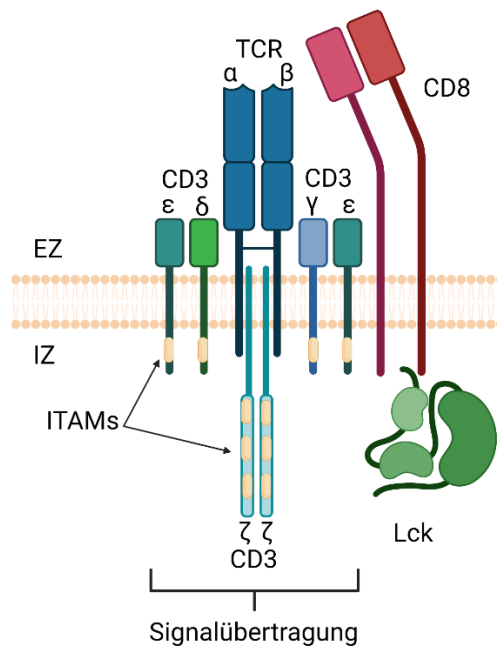
Die verschiedenen T-Zellpopulationen im menschlichen Körper lassen sich in konventionelle und unkonventionelle T-Zellen unterteilen, die sich in ihren T-Zell-Rezeptoren, den Antigenen, die sie erkennen, sowie ihren Funktionen unterscheiden<sup>36</sup>.

### 2.3.1 Konventionelle T-Zellen

Konventionelle T-Zellen sind  $\alpha\beta$ T-Zellen, die dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden. Dazu gehören CD4<sup>+</sup> T-Zellen, auch T-Helfer-Zellen genannt, und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Der T-Zell-Rezeptor konventioneller T-Zellen besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, deren jeweilige konstante Domänen (TRAC, engl. *T-cell receptor alpha-chain, constant domain* und TRBC, engl. *T-cell receptor beta-chain, constant domain*) in der Zellmembran verankert sind, während die variablen, der Antigenerkennung dienenden Regionen in den extrazellulären Bereich gerichtet sind. Die  $\alpha$ -Kette fügt sich aus einem V (TRAV, engl. *T-cell receptor alpha chain, variable region*) – und einem J (TRAJ, engl. *T-cell receptor alpha chain, junction region*) –Segment zusammen, die  $\beta$ -Kette enthält neben V (TRBV, engl. *T-cell receptor beta chain, variable region*) und J (TRBJ, engl. *T-cell receptor beta chain, junction region*) zusätzlich ein D (TRBD, engl. *T-cell receptor beta chain, diversity region*) –Segment<sup>32</sup>. Da im menschlichen Genom von jedem Segment vielfache Varianten existieren und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten während der T-Zell-Reifung im Thymus zufällig rekombiniert werden<sup>32</sup>, können theoretisch bis zu  $10^{20}$  T-Zell-Rezeptoren (TCR, engl. *T-cell receptor*) verschiedener Spezifität

generiert werden, wobei die tatsächlich im Menschen vorkommende Anzahl der verschiedenen TCRs bei etwa  $5 \times 10^6$  liegt<sup>37</sup>.

Die konventionellen T-Zellen benötigen für ihre initiale Aktivierung (*priming*) zwei Signale: die produktive Bindung des TCRs an ein über MHC-Moleküle präsentiertes Peptid sowie ein co-stimulatorisches Signal durch die Bindung von CD28 auf der T-Zell-Oberfläche an B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf APCs<sup>32</sup>. Die Bindung des TCR an den Peptid-präsentierenden MHC-Komplex und die zusätzliche Anlagerung der Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 an die MHC-Moleküle führt zur Phosphorylierung der ITAMs (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) der CD3-Untereinheiten durch die Kinase Lck (engl. *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), die mit den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 assoziiert ist<sup>38</sup>. An die phosphorylierten ITAMs bindet die Tyrosinkinase ZAP-70 (engl. *Zeta-Associated-Protein 70*), welche daraufhin ebenfalls von Lck phosphoryliert wird und ihrerseits weitere intrazelluläre Signalmoleküle aktiviert. Über eine mehrstufige Signaltransduktionskaskade werden die Transkriptionsfaktoren NFAT (engl. *Nuclear Factor of Activated T cells*), NFκB (engl. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und AP-1 (engl. *Activator Protein 1*) aktiviert, die schließlich die Transkription des Gens für IL-2 initiieren. IL-2 ist essenziell für die Differenzierung und Proliferation der T-Zellen. Daneben fördert die Aktivierung der T-Zellen über den TCR das Zellüberleben, den Stoffwechsel, die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie die Steigerung der Adhäsivität<sup>39</sup>.



**Abbildung 4: Der  $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor.** Der  $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor (TCR) konventioneller T-Zellen ist aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette aufgebaut, deren konstante Domänen in der Zellmembran verankert sind, während sich die variablen Domänen, die der Antigenerkennung dienen, extrazellulär befinden. Zur Aktivierung der T-Zelle muss der TCR an ein über MHC-Moleküle präsentiertes Peptid binden. Auch die Co-Rezeptoren CD4 und CD8 binden an das MHC-Molekül, woraufhin die Kinase Lck (engl. *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) die ITAMs (engl. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) der CD3-Untereinheiten phosphoryliert und damit eine Signalkaskade in Gang setzt. Die Aktivierung der T-Zelle über ihren TCR fördert das Zellüberleben, die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen. EZ: Extrazellulärraum IZ: Intrazellulärraum. Angelehnt an Janeway Immunologie, 2018<sup>32</sup>, und La Gruta et al., 2018<sup>38</sup>, erstellt mit BioRender.com.

### 2.3.2 Unkonventionelle T-Zellen

Unkonventionelle T-Zellen vereinen sowohl Eigenschaften des adaptiven, spezifischen als auch des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Sie repräsentieren etwa 10 % der im Blut zirkulierenden T-Zellen und einen Großteil der T-Zellen in Geweben wie der Leber oder der Mukosa des Magen-Darm-Traktes<sup>40</sup>. Sie unterscheiden sich von konventionellen T-Zellen durch eine schnellere T-Zell-Antwort, der unterschiedlichen Verteilung in Geweben und erkennen endogene und exogene „Nicht-Peptid-Antigene“, wie z.B. Lipid- und Phospho-Antigene<sup>36</sup>. Diese Subgruppe der T-Zellen lässt sich in iNKT-Zellen (engl. *invariant Natural Killer T cells*), MAIT-Zellen (engl. *Mucosa-Associated Invariant T cells*), Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und  $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilen<sup>41</sup>. Ähnlich wie konventionelle T-Zellen exprimieren sie TCRs, jedoch zeigen sie im Gegensatz zu diesen ein deutlich reduziertes T-Zell-Rezeptor-Repertoire und sind nicht MHC-restringiert<sup>36</sup>. Alle menschlichen iNKT-Zellen weisen die gleiche  $\alpha$ -Kette sowie ein begrenztes Repertoire an möglichen  $\beta$ -Ketten auf und erkennen über CD1d präsentierte Lipidantigene. Bei MAIT-Zellen findet sich lediglich ein begrenztes Repertoire sowohl an  $\alpha$ - als auch an  $\beta$ -Ketten. Im Gegensatz zu iNKT-Zellen wird ihre Proliferation und Funktion über MR1, ein nicht-polymorphes, MHC-Klasse I-verwandtes Protein, kontrolliert<sup>42</sup>. MAIT-Zellen erkennen über MR1 Vitamin-B-Stoffwechselmetabolite und spielen eine Rolle in der Abwehr von Bakterien und Hefepilzen<sup>40</sup>. Anstelle der wenig variablen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der iNKT- und MAIT-Zellen zeigen die TCRs von  $\gamma\delta$ T-Zellen durch Rekombination der V-, D-, J- und C-Regionen eine deutlich größere, aber im Vergleich zu den Rezeptoren konventioneller T-Zellen dennoch geringere Diversität in ihrer Zusammensetzung<sup>43</sup>. Eine Subgruppe der  $\gamma\delta$ T-Zellen erkennt ebenfalls über CD1 präsentierte Lipide. Andere erkennen beispielsweise auf Tumorzellen Phosphoantigene über die Bindung an Butyrophilin 3A1 (BTN3A1), welches eine ähnliche Struktur wie die co-stimulatorischen B7-Moleküle aufweist<sup>44</sup>. Zusätzlich können so auch gestresste Zellen über die Expression von MHC-Klasse I-ähnlichen Molekülen wie MHC-Klasse Ib, zu welchen beim Menschen HLA-E, HLA-F, HLA-G und HFE (engl. *High Fe*) zählen, erkannt werden<sup>43</sup>. Unkonventionelle T-Zellen sind ebenso wie konventionelle T-Zellen an der Erkennung und Elimination von Tumorzellen beteiligt, indem sie durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  unter anderem NK-Zellen und konventionelle T-Zellen stimulieren und mittels Granzymen eine direkte zytolytische Wirkung erzielen<sup>43</sup> (2.2.2.1).

### 2.3.3 HLA-unabhängige $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren im Melanommodell Ma-Mel-86

Neben unkonventionellen T-Zellen wurden inzwischen auch konventionelle  $\alpha\beta$ T-Zellen beschrieben, deren T-Zell-Rezeptoren Antigene unabhängig von HLA-Molekülen erkennen<sup>45</sup>. Wie eingangs erwähnt, wurden im humanen Melanommodell Ma-Mel-86 bislang zwei Antigene identifiziert, die von CD8-positiven  $\alpha\beta$ T-Zellen aus Blut der Patientin auf autologen Melanomzellen HLA-unabhängig erkannt wurden<sup>46</sup>. Bei den Antigenen handelte es sich um die  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), abgekürzt CSF2RA (engl. *GM-CSF-Receptor alpha chain*, Synonym *Colony Stimulating Factor 2 Receptor, alpha*), und um TRP2 (engl. *Tyrosinase-Related Protein 2*, Synonym *Dopachrom-Tautomerase, DCT*)<sup>46</sup>. CSF2RA-reaktive CTL erkannten über autologe Melanomzelllinien hinaus auch allogene Melanomzelllinien, akute myeloische Leukämien (AML) und Karzinomzelllinien aus Pankreas, Ovar, Lungen und Gallenblase<sup>46</sup>.

Über die letzten Jahrzehnte wurden mehrere Antigene veröffentlicht, die HLA-unabhängig von  $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Zu diesen gehört unter anderem MUC1 (Mucin 1), welches im Besonderen von Mamma- und Pankreaskarzinomzellen exprimiert wird<sup>47</sup>. 2011 identifizierten Hanada et al. den TRAIL-DR4 (TRAIL-Rezeptor-1) -Komplex auf Tumorzellen als Zielantigen für CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut eines Nierenzellkarzinompatienten<sup>45</sup>. Weiterhin wies die Arbeitsgruppe von Alfred Singer in MHC-Klasse I/II- sowie CD4/CD8-defizienten QuadKO Mäusen die Existenz eines MHC-unabhängigen  $\alpha\beta$ T-Zell-Repertoires nach. Als Zielantigen dieser T-Zellen identifizierten sie bislang CD48, CD102 und CD155<sup>48</sup>. Diese HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptoren zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu konventionellen, HLA-

restringierten  $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren **(2.3.1)**<sup>49,39</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die HLA-unabhängigen TCRs aus QuadKO-Mäusen eine viel höhere Affinität zu ihren Liganden aufweisen als HLA-restringierte TCRs und darüber hinaus autoreaktiv sein können<sup>39</sup>. Die Liganden der MHC-unabhängigen TCRs konnten als Selbstantigene identifiziert werden, deren Expression in mehreren Zellarten verschiedener, gesunder Gewebe nachgewiesen wurde<sup>49,39</sup>. Es wurde postuliert, dass MHC-unabhängige TCRs in ihrer Antigen-Erkennung Antikörpern ähneln<sup>39</sup>.

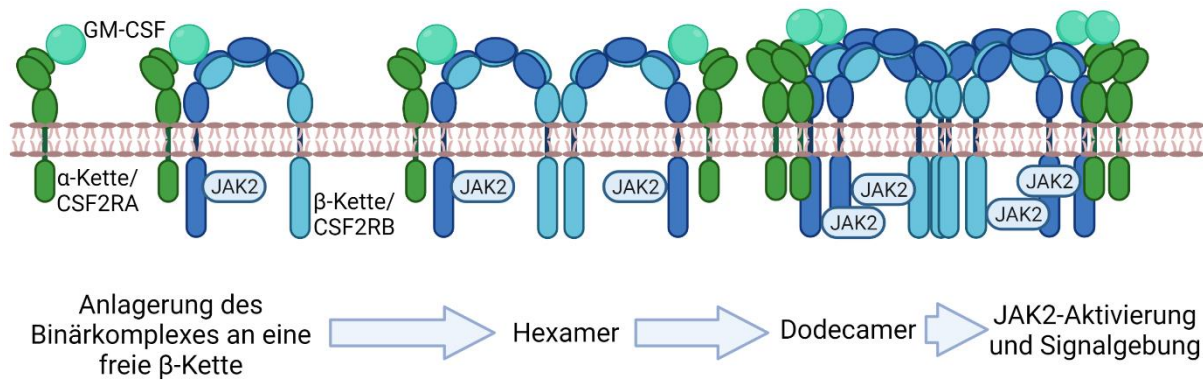
Zur Erklärung der MHC-Restriktion von T-Zell-Rezeptoren existieren zwei Modelle: das Selektionsmodell und das Keimbahn-kodierte Modell. Das Keimbahn-kodierte Modell besagt, dass durch die gemeinsame Evolution der TCR- und MHC-Gene eine Selektion hin zu der Erkennung intrinsischer MHC-Moleküle durch TCRs stattgefunden hat. Dafür sprechen konservierte Aminosäure-Motive in den CDRs (engl. *Complementary Determining Region*) 2 und 3 der TCRs, die direkt mit MHC-Molekülen in Kontakt treten. Nach diesem Modell ist die HLA-Unabhängigkeit von TCRs eine nicht intendierte und auf Kreuzreaktivität zurückzuführende Eigenschaft einiger TCRs<sup>38</sup>. Im Selektionsmodell hingegen ist die MHC-Restriktion von TCRs nicht auf eine intrinsische Veranlagung zurückzuführen, sondern eher auf die Selektion der T-Zellen im Thymus. Da für die effektive Signalgebung über den TCR die Tyrosin-Protein-Kinase Lck in der Nähe der ITAMs der CD3-Domäne lokalisiert werden muss und die Effizienz dieser Verlagerung der Lck maßgeblich von der Bindung der Co-Rezeptoren CD4 und CD8 an die MHC-Moleküle der APC abhängt, könnte dies zu einer Selektion zugunsten der MHC-restringierten TCRs führen<sup>38</sup>.

Unter Berücksichtigung bestimmter Immunevasions-Mechanismen wie dem HLA-Verlust stellen HLA-unabhängige T-Zellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, HLA-defiziente Tumorzellen, die nicht mehr oder nur noch sehr schlecht durch HLA-abhängige Immuntherapien behandelbar sind, zu eliminieren. Ein weiterer Vorteil der HLA-unabhängigen TCRs besteht darin, dass mit ihnen Patienten unabhängig von ihrem HLA-Typ behandelt werden könnten, sofern das TCR-spezifische Antigen exprimiert wird. Somit könnte einer größeren Anzahl an Tumorerkrankten noch eine Therapiemöglichkeit angeboten werden. Im Folgenden werden CSF2RA, eine Untereinheit des humanen GM-CSF-Rezeptors und gleichzeitig vielversprechendes Zielantigen von HLA-unabhängigen T-Zell-Therapien, sowie der GM-CSF-Rezeptor vorgestellt und ihre physiologischen Funktionen, ihr Vorkommen und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit malignen Tumoren genauer beleuchtet.

## 2.4 Der GM-CSF-Rezeptor und CSF2RA

### 2.4.1 Der strukturelle Aufbau des GM-CSF-Rezeptors

Der GM-CSF-Rezeptor ist ein Heterodimer, der aus einer Liganden-bindenden  $\alpha$ -Kette (CSF2RA, Synonym CD116, engl. *Cluster of Differentiation 116*) und einer Signalübertragenden  $\beta$ -Kette (CSF2RB, Synonym CD131, engl. *Colony Stimulating Factor 2 Receptor, beta*) besteht<sup>50</sup>. Die  $\beta$ -Kette stellt zudem auch eine Untereinheit der humanen IL-3- und IL-5-Rezeptoren dar (engl. *common  $\beta$ -receptor,  $\beta c$* ). Einzeln weisen  $\alpha$ -Ketten lediglich eine geringe Affinität zu ihrem Liganden GM-CSF auf, die allerdings durch Dimerisierung mit  $\beta$ -Ketten deutlich gesteigert wird<sup>50</sup>. Nach Ligandenbindung bildet sich zunächst aus zwei  $\alpha$ -Ketten, zwei  $\beta$ -Ketten und zwei GM-CSF-Molekülen ein Hexamer aus. Zur Aktivierung des GM-CSF-Rezeptors mit nachfolgender intrazellulärer Signaltransduktion bedarf es jedoch zusätzlich der Bildung eines Dodecamer-Komplexes, der sich seinerseits aus zwei Hexameren zusammensetzt<sup>50</sup>. Die intrazelluläre Signaltransduktion wird dann über JAK2 (Januskinase 2) initiiert und resultiert schließlich in der Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden wie JAK/STAT (Januskinase/engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*), MAPK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) und PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), die die Differenzierung und Proliferation der Zellen fördern.



**Abbildung 5: Die molekulare Zusammensetzung des GM-CSF-Rezeptors.** Zunächst bindet GM-CSF an die  $\alpha$ -Untereinheit (CSF2RA) des GM-CSF-Rezeptors. Dieser Binärkomplex lagert sich an eine freie  $\beta$ -Kette des späteren Rezeptors (CSF2RB) an. Aus zwei  $\alpha$ -Ketten, zwei  $\beta$ -Ketten und zwei GM-CSF-Molekülen bildet sich dann ein Hexamer aus, woraufhin zwei Hexamere einen Dodecamer-Komplex formen. Erst als Dodecamer-Komplex kann der GM-CSF-Rezeptor über JAK2 eine Signalgebung initiieren, die schließlich zur Proliferation und Differenzierung der Zelle führen. GM-CSF: Granulocyte, Macrophage-Colony Stimulating Factor JAK2: Janus Kinase 2. Angelehnt an Hansen et al., 2008<sup>51</sup>, erstellt mit BioRender.com.

## 2.4.2 Die menschliche Hämatopoese und CSF2RA

Die Hämatopoese ist ein hierarchisch organisierter und lebenslang ablaufender Prozess zur Bildung und ständigen Erneuerung von Blutzellen verschiedener Art<sup>52</sup>. Im Laufe der Entwicklung findet die Hämatopoese in unterschiedlichen Geweben statt. Die Orte der fetalen Hämatopoese sind der Dottersack des Embryos, die Leber, die Milz und das rote Knochenmark, während die adulte Hämatopoese im roten Knochenmark stattfindet<sup>53</sup>. In der Hämatopoese lassen sich zwei große Entwicklungsreihen unterscheiden, deren Ursprung CD34<sup>+</sup> Stammzellen darstellen: die myeloische und die lymphatische Reihe<sup>53</sup>. Aus myeloischen Vorläuferzellen entwickeln sich Mastzellen, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Erythrozyten<sup>54</sup>. Die lymphatischen Vorläuferzellen differenzieren dagegen zu NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten<sup>53</sup>. Dendritische Zellen nehmen in der Hämatopoese einen besonderen Platz ein, denn sie können ihren Ursprung sowohl in der myeloischen als auch in der lymphatischen Reihe haben<sup>55</sup>.

### 2.4.2.1 Charakteristika hämatopoetischer Stammzellen

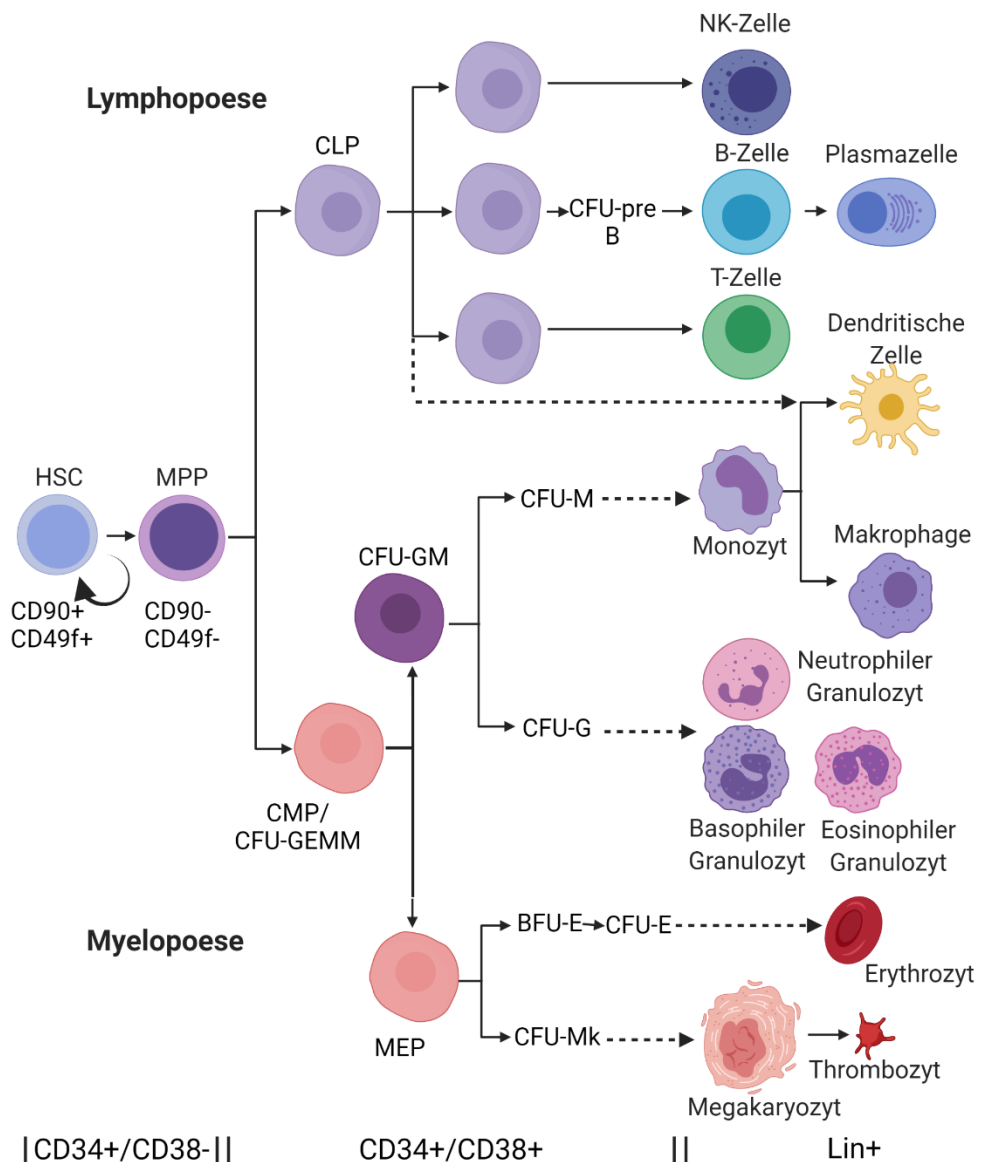
Alle Zellen des Blutes sowohl der lymphatischen als auch der myeloischen Reihe lassen sich auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurückführen, welche die Basis des hierarchisch aufgebauten blutbildenden Systems bildet – die hämatopoetische Stammzelle (engl. *Hematopoietic Stem Cell*, HSC). Charakteristisch für hämatopoetische Stammzellen sind deren lebenslange Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie der Bildung sämtlicher Blutzellen über streng regulierte Differenzierungsstadien<sup>54</sup>. Darüber hinaus sind HSCs sehr selten, denn sie repräsentieren nur etwa jede millionste Zelle im Knochenmark<sup>52</sup>. Deshalb ist es zur spezifischen Anreicherung von HSCs für die Forschung und klinische Verwendung in der Stammzelltransplantation wichtig, anhand von Oberflächenmarkern zwischen HSCs und differenzierteren Blutzellen unterscheiden zu können. Civin et al. haben bereits 1984 CD34 als ersten und auch in der heutigen Zeit noch wichtigsten Oberflächenmarker für HSCs und frühe Vorläuferzellen entdeckt<sup>56</sup>. CD34 wird von weniger als 5% aller Blutzellen exprimiert, wobei Berechnungen nach über 99% aller HSCs CD34-positiv sind<sup>52</sup>. Als weitere Oberflächenmarker, die hämatopoetische Stammzellen von multipotenten Vorläuferzellen (engl. *Multipotent Progenitors*, MPP) abgrenzen, sind CD90 (Synonym Thy1)<sup>57</sup> und CD49f (Synonym Integrin  $\alpha 6$ ) zu nennen<sup>58</sup>. Sowohl HSCs und MPPs sind CD34-positiv und CD38-negativ, wohingegen die oligopotente Vorläuferzellen, die entweder zur Bildung lymphatischer oder aber myeloischer Nachkommen befähigt sind, neben CD34 auch CD38 exprimieren<sup>52</sup>.

#### 2.4.2.2 CSF2RA und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen

Für die Differenzierung der HSCs zu reifen Blutzellen spielen verschiedene Transkriptionsfaktoren eine Rolle, die abhängig vom Grad der Differenzierung variieren<sup>54</sup> und deren Aktivität sich innerhalb des menschlichen Alterungsprozesses verändert<sup>59</sup>. Wichtige Transkriptionsfaktoren der HSC für ihr Überleben und die Aufrechterhaltung ihrer Selbsterneuerung sind beispielsweise HOXB4 und BMI1<sup>52</sup>, die regelrechte Differenzierung zu lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen wird hingegen über RUNX1 reguliert<sup>54</sup>. Für die Differenzierung zu Erythrozyten und Thrombozyten ist der Transkriptionsfaktor GATA1 essenziell, für Granulozyten und Monozyten PU.1 und für T-Lymphozyten Notch<sup>54</sup>. Mutationen oder Translokationen vieler dieser Gene sind assoziiert mit Leukämien<sup>54</sup>, aber auch mit soliden Tumoren<sup>52</sup>.

Neben Transkriptionsfaktoren sind verschiedene Zytokine bedeutsam für die Hämatopoese. Zu diesen gehören unter anderem der Stammzell-Faktor (SCF, Synonym c-Kit-Ligand)<sup>54</sup>, Erythropoetin und Thrombopoetin, aber auch die Kolonie-stimulierenden Faktoren (engl. *Colony-Stimulating Factors*, CSF) wie GM-CSF<sup>60</sup>. Kolonie-stimulierende Faktoren sind nach ihrer Fähigkeit benannt, hämatopoetische Vorläuferzellen zur Differenzierung zu reiferen Blutzellen einer bestimmten Linie anzuregen<sup>60</sup>. Eine einzelne Vorläuferzelle trägt die Bezeichnung Kolonie-bildende Einheit (engl. *Colony Forming Unit*, CFU), die durch die Zellarten ihrer Nachfahren weiter spezifiziert wird<sup>61</sup>. So ist eine CFU-E (engl. *Colony-Forming Unit-Erythroid*) in der Lage, sich zu differenzierteren Erythrozytenvorläufern zu entwickeln<sup>62</sup>. Während Erythropoetin ausschließlich die Erythropoese stimuliert, ist die Wirkung von GM-CSF nicht nur auf Granulozyten und Makrophagen restringiert<sup>60</sup>.

Aus diesem Grund wird auch CSF2RA als Teil des GM-CSF-Rezeptors auf mehreren hämatopoetischen Zellen der myeloischen Reihe wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, DCs sowie deren jeweiligen Vorläuferzellen exprimiert<sup>32,5</sup>. Die Aktivierung des GM-CSF-Rezeptors stimuliert das Zellüberleben, ihre Proliferation und die zunehmenden Differenzierung dieser Zellen<sup>63</sup>. GM-CSF wird von verschiedenen Zellarten wie aktivierten B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert<sup>64</sup>. Im Rahmen einer Entzündung produzieren durch GM-CSF aktivierte myeloische Zellen wiederum selbst proinflammatorische Zytokine und Chemokine, welche sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems aktivieren und mobilisieren<sup>65</sup>. Neben hämatopoetischen Zellen der myeloischen Reihe wurde die Expression des GM-CSF-Rezeptors unter anderem auf Fibroblasten<sup>66</sup>, Endothelzellen<sup>67</sup>, Neuronen<sup>68</sup> und Trophoblasten<sup>4</sup> nachgewiesen.



**Abbildung 6: Die menschliche Hämatopoese.** Alle Zellen des blutbildenden Systems entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (HSC) über multipotente Progenitorzellen (MPP), welche weiter zu CD38<sup>+</sup> Vorläufern der myeloischen (CMP) und der lymphatischen Reihe (CLP) differenzieren. Als Zwischenschritte dieses Reifeprozesses können unreife Zellen unter dem Einfluss verschiedener Zytokine unterschiedliche Koloniebildende Einheiten (CFU) formen. Anhand spezifischer Oberflächenmarker (CD, Lin) können hämatopoetische Zellen bestimmten Entwicklungsstufen und Linien zugeordnet werden. Eine Besonderheit in der Hämatopoese stellen dendritische Zellen dar, die sowohl myeloischen als auch lymphatischen Vorläufern entstammen können. CMP: Common Myeloid Progenitor Cell CLP: Common Lymphoid Progenitor Cell CFU-: Colony Forming Unit-GEMM: Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte GM: Granulocyte, Macrophage M: Macrophage G: Granulocyte Mk: Megakaryocyte pre-B: B-Vorläuferzelle MEP: Megakaryocyte-Erythroid Progenitor Cell E: Erythroid BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid Lin: spezifische Oberflächenmarker reifer Zellpopulationen Angelehnt an Dulatov et al., 2012<sup>52</sup>, und Wognum und Szilvassy, 2015<sup>69</sup>, adaptiert aus „Stem Cell Differentiation from Bone Marrow“, BioRender.com (2021), abgerufen über <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

### 2.4.3 Die Funktionen des GM-CSF-Rezeptors sowie von CSF2RA und GM-CSF im Rahmen maligner und nicht-maligner Erkrankungen

Die Wirkungen von GM-CSF über den GM-CSF-Rezeptor und CSF2RA sind vielfältig und spielen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle. Während die GM-CSF-Konzentration im Serum im physiologischen Zustand sehr niedrig oder nicht messbar ist, steigt die GM-CSF-Konzentration deutlich bei einer Aktivierung des Immunsystems durch die damit einhergehende Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  an<sup>64</sup>. Eine Dysregulation der GM-CSF-Rezeptor-Expression kann unter anderem bei autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Glomerulonephritis<sup>70</sup> oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen<sup>71</sup> beobachtet werden. Hierfür scheint der positive Feedback-Mechanismus der GM-CSF-Sekretion mitverantwortlich zu sein, der in einer übersteigerten Aktivierung des Immunsystems resultiert<sup>65</sup>.

Außerdem lösen Mutationen in CSF2RA- und CSF2RB-Genen, die den GM-CSF-Signalweg beeinträchtigen, die erbliche Form der Lungenerkrankung PAP (engl. *Pulmonary alveolar proteinosis*) aus. Bei dieser kann es aufgrund der fehlenden Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch GM-CSF zu einer Akkumulation von *Surfactant* in den Alveolen, vermehrten Atemwegsinfektionen und respiratorischen Beschwerden bis hin zum Lungenversagen kommen<sup>72</sup>.

Zusätzlich werden auch Effekte beschrieben, die unabhängig von der  $\beta$ -Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors, also ausschließlich über CSF2RA vermittelt werden. So wurde in humanen Embryonen eine physiologische Hemmung der Apoptose über CSF2RA gezeigt<sup>73</sup>, und eine verringerte CSF2RA-Expression im Hippocampus wurde mit einer Progression der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht<sup>68</sup>.

Auch für maligne Erkrankungen kann die Expression von CSF2RA und GM-CSF von großer Relevanz sein. So lässt sich bei einer Vielzahl verschiedener Tumorerkrankungen wie dem Kolorektal-, Bronchial-, Ovarialkarzinom, Gliomen, dem malignen Melanom oder Leukämien eine veränderte Expression von CSF2RA auf mRNA- oder Proteinebene nachweisen<sup>2</sup>. Des Weiteren wird GM-CSF von Tumorzellen diverser Tumorentitäten selbst sezerniert<sup>74</sup>.

Es werden verschiedene, sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Funktionen des GM-CSF-Rezeptors und seines Liganden GM-CSF postuliert<sup>64</sup>. Doch während in manchen Tumoren erhöhte Zellmotilität, Angiogenese und Vaskularisierung beobachtet wird<sup>74</sup>, soll speziell GM-CSF bei anderen Tumorentitäten die antitumorale Immunantwort verstärken, indem durch DCs vermittelt tumorspezifische T-Zellen aktiviert werden<sup>64</sup>.

In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass GM-CSF und der GM-CSF-Rezeptor essenziell für die Entwicklung und Progression der juvenilen myelomonozytäre Leukämie (JMML) sowie der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML) sind<sup>50</sup>. In humanen Melanomzellen konnte eine CSF2RA-abhängige Erhöhung der Glukoseaufnahme beobachtet werden, was darauf hinweisen könnte, dass CSF2RA positive metabolische Effekte auf CSF2RA-exprimierende Tumorzellen haben könnte<sup>75</sup>. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass CSF2RA beispielsweise in der AML mit der Translokation t(8;21) durch Induktion der Apoptose und Hemmung der Proliferation als Tumorsuppressor agiert<sup>76</sup>.



## 2.5 GM-CSF und CSF2RA im Kontext aktueller Therapien

Die Tatsache, dass CSF2RA maßgeblich an der Pathogenese und Progression verschiedener maligner sowie autoimmuner/inflammatorischer Krankheitsbilder beteiligt ist, lässt CSF2RA zu einem vielversprechenden Zielmolekül neuer, potenterer Therapien werden und könnte so dazu beitragen, das bereits bestehende Repertoire an möglichen Therapieformen entscheidend zu erweitern.

### 2.5.1 GM-CSF versus monoklonale Antikörper gegen CSF2RA bei Covid-19-Patienten

Während der Covid-19 (engl. *Coronavirus disease 2019*) -Pandemie, die durch das Virus SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) ausgelöst wurde, haben GM-CSF und der GM-CSF-Rezeptor breites Interesse erlangt.

Einerseits wurde vor dem Hintergrund, dass eine GM-CSF-Expression in der Lunge in präklinischen Studien eine fördernde Wirkung auf die Reparatur von durch Pneumonie geschädigtem Lungengewebe hatte und darüber hinaus durch eine Aktivierung des adaptiven und angeborenen Immunsystems eine verstärkte Pathogenbeseitigung beobachtet wurde, GM-CSF als Therapiemöglichkeit bei Covid-19-Erkrankten in Betracht gezogen. Deshalb wurde unter anderem die Gabe von Sargramostim, rekombinantes humanes GM-CSF, untersucht<sup>65</sup>. Andererseits wurden monoklonale Antikörper (engl. *monoclonal antibodies*, mAbs) sowohl gegen GM-CSF als auch den GM-CSF-Rezeptor als Therapeutika erforscht, da schwere Covid-19-Verläufe häufig mit einer Zerstörung des Lungengewebes, Hyperkoagulation und einem sogenannten Zytokinsturm einhergehen, für welche die übersteigerte Aktivierung myeloischer Immunzellen durch GM-CSF mitverantwortlich gemacht wird<sup>65</sup>. Mavrilimumab, ein monoklonaler IgG4-Antikörper gegen CSF2RA<sup>77</sup>, zeigte eine gute Verträglichkeit sowohl in Studien mit Covid-19-Patienten als auch in vorangegangenen Studien mit an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten und Patientinnen. Jedoch lieferten verschiedene Studien mit an Covid-19-Erkrankten uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich der Endpunkte des Gesamtüberlebens, der Notwendigkeit einer Sauerstofftherapie und der Verbesserung des klinischen Zustandes<sup>78,79</sup>. Die Effektivität der Mavrilimumab-Therapie bei Patienten und Patientinnen mit rheumatoider Arthritis konnte hingegen bereits bestätigt werden<sup>80</sup>.

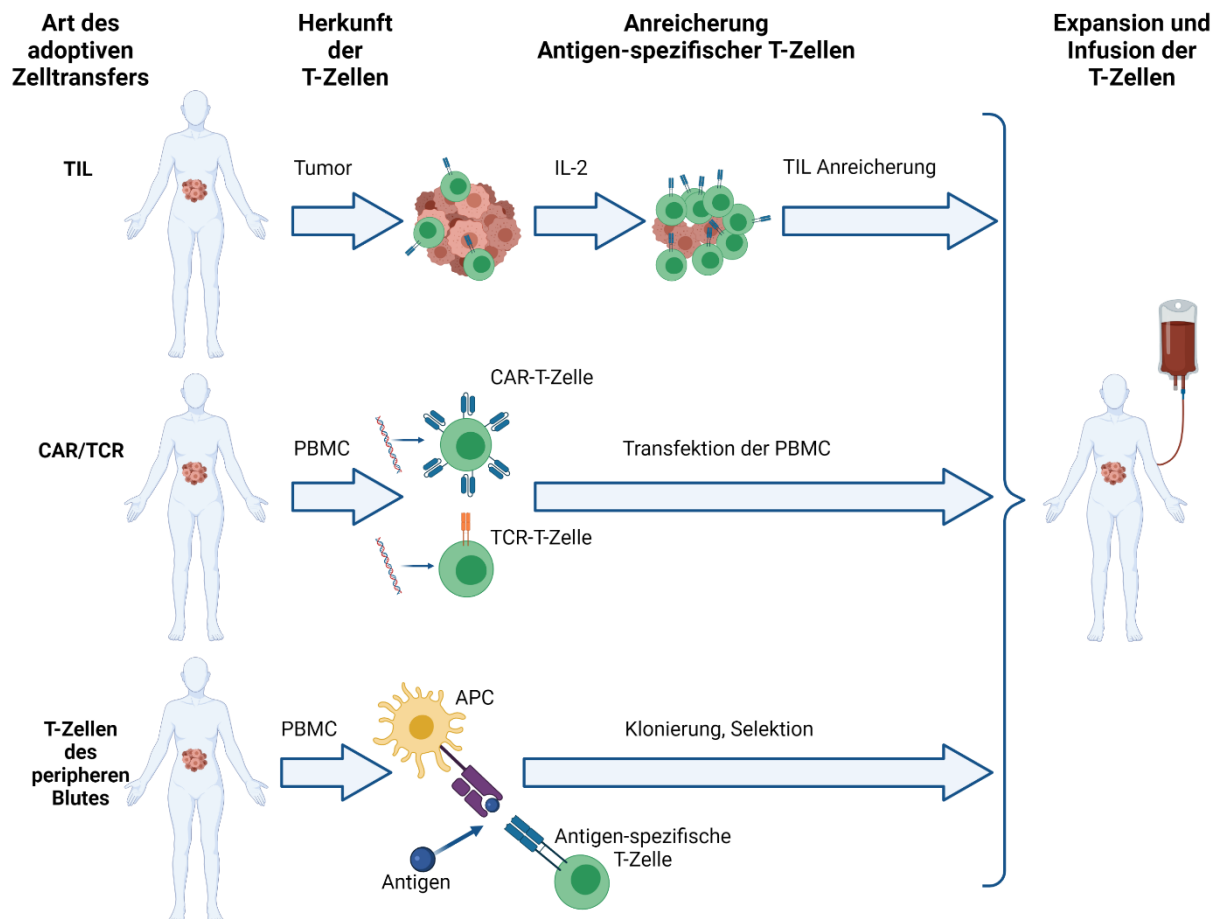
### 2.5.2 Möglichkeiten der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen und CSF2RA als Target

Im Rahmen der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen werden für GM-CSF sowohl suppressive als auch stimulierende Wirkungen auf das Tumorstadium diskutiert **(2.4.3)**<sup>64,81</sup>. Da viele hämatologische Tumoren<sup>82</sup>, aber auch andere Tumorentitäten den GM-CSF-Rezeptor exprimieren<sup>4</sup>, wird vor der Applikation von GM-CSF eine Abwägung der durch GM-CSF induzierten Tumorremission gegenüber den Risiken einer Tumorstimulation und der Förderung hämatologischer Sekundärmalignome verlangt<sup>83</sup>. Als Standardtherapie wird heutzutage jedoch vor allem G-CSF sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprophylaxe von Infektionen bei Tumorerkrankten nach Chemotherapie oder im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation zur Verkürzung der durch die Antitumortherapie verursachten Neutropenie angewandt<sup>84</sup>.

Aufgrund der tiefgreifenden Erkenntnisse über die Entstehung maligner Erkrankungen<sup>13</sup>, die duale Rolle unseres Immunsystems bezüglich Tumor-Promotion und -Suppression<sup>25</sup> und aufgrund des stetig wachsenden Wissens um die Fähigkeiten von Tumorzellen, sich dem Immunsystem zu entziehen<sup>1,25</sup>, erschlossen sich in den letzten Jahren vielerlei Möglichkeiten, noch gezieltere Antitumortherapien zu entwickeln. Dies führte zu einer Vielfalt an therapeutischen Antikörpern, die Tumortargetstrukturen direkt adressieren<sup>85</sup>. Als Vorreiter monoklonaler Antikörper in der Onkologie hat sich Rituximab, gegen das Oberflächenmolekül CD20 gerichtet, als ein fester Bestandteil in der Behandlung maligner B-Zell-Lymphome

etabliert<sup>86</sup>. Darüber hinaus wurden Antikörper entwickelt, die sich gegen Immunbarrieren richten. 2018 wurde der Nobelpreis für die Entdeckung der Immun-Checkpoints CTLA-4 und PD-1 verliehen<sup>87</sup>, die den Weg für die Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) anti-CTLA-4, anti-PD-1 und anti-PD-L1 als effektive Therapie gegen verschiedene Malignome geebnet hat<sup>88</sup>. Doch im Zeitalter der personalisierten Medizin stellen ICIs und andere monoklonale Antikörper nur einen Teil der heutigen, individualisierten Therapiemöglichkeiten dar.

Da insbesondere T-Zellen eine essenzielle Bedeutung in der Anti-Tumor-Immunität zugeschrieben wird<sup>23</sup>, sind Tumolvakzine<sup>89</sup> und der adoptive T-Zell-Transfer Gegenstand vieler aktueller Forschungsprojekte. Im Gegensatz zu Tumolvakzinen wurde die CAR-T-Zell-Therapie neben dem allogenen hämatopoetischen Stammzelltransfer (HSCT) bereits als Verfahren des adoptiven Zell-Transfers zugelassen<sup>90</sup>. Beim adoptiven T-Zell-Transfer wird zwischen dem Transfer tumorinfiltrierender T-Lymphozyten (TILs) und dem Transfer genmodifizierter T-Zellen, die mit T-Zell-Rezeptoren (TCR-T-Zellen) oder chimärisierten Antigen-Rezeptoren (CAR) ausgestattet wurden, unterschieden<sup>91</sup>. Das Prinzip des T-Zell-Transfers beruht auf der Entnahme autologer T-Zellen aus Tumorpatienten, ihrer ex vivo-Expansion und gegebenenfalls genetischen Modifikation sowie der anschließenden Reinfusion, um eine antitumorale T-Zell-Antwort zu etablieren<sup>92</sup>.

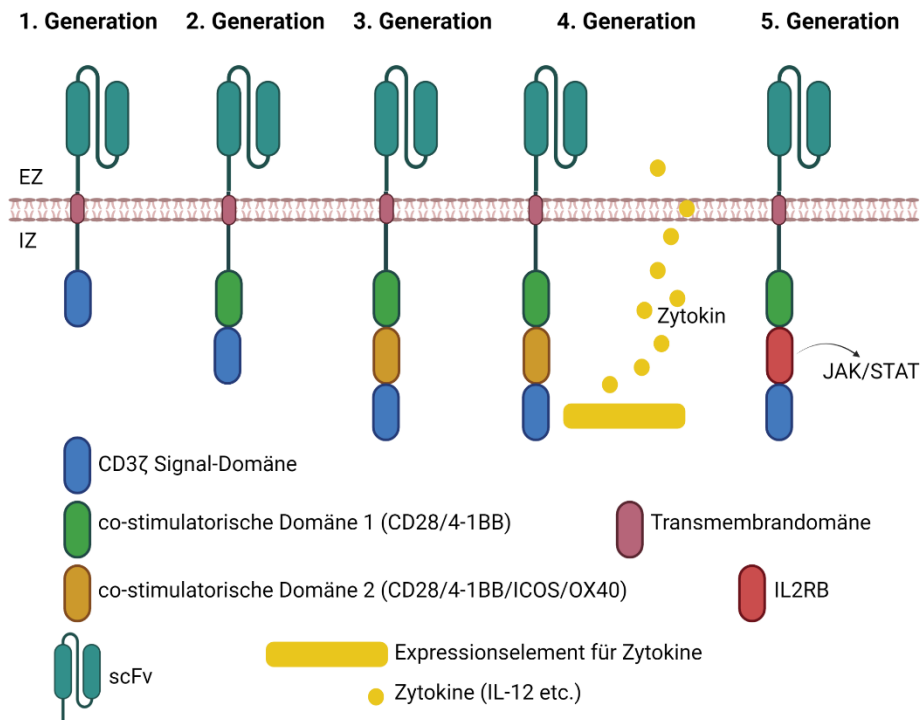


**Abbildung 7: Möglichkeiten des adoptiven T-Zell-Transfers.** Der adoptive T-Zell-Transfer unterscheidet drei Herangehensweisen – die Anreicherung von aus Tumorgewebe extrahierten, Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit Interleukin-2 (IL-2), das Einbringen Antigen-spezifischer chimärisierter Antigen-Rezeptoren (CAR) oder T-Zell-Rezeptoren (TCR) in autologe T-Zellen aus peripherem Blut ) und die Selektion Antigen-spezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut mittels *in vitro* Stimulation durch autologe, mit dem TCR-spezifischen Peptid-beladenen Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Nach der Expansion der Tumor-spezifischen T-Zellen *ex vivo* werden diese reinfundiert und vermitteln die Zerstörung der Tumorzellen. Angelehnt an Yee, 2013<sup>93</sup>, erstellt mit BioRender.com.

### 2.5.2.1 CAR-T-Zellen

CAR-T-Zellen gegen CD19, ein Oberflächenantigen von B-Lymphozyten, stellen eine bereits zugelassene Therapiemöglichkeit der akuten lymphatischen B-Zell-Leukämie (ALL), des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) und des Mantelzell-Lymphoms (MCL) dar<sup>94</sup>. Die 2021 zugelassenen CAR-T-Zellen gegen das B-Zell-Reifungsantigen (engl. *B-cell maturation antigen*, BCMA) ermöglichen eine Therapie des refraktären Multiplen Myeloms (MM)<sup>95</sup>. Im Gegensatz zu hämatologischen Malignomen zeigen solide Tumoren bisher weniger erfolgreiche Ansprechraten auf CAR-T-Zell-Therapien. Gründe dafür sind deren immunsuppressive Tumorumgebung, aber auch der Mangel an adäquaten Zielantigenen, wodurch Sicherheit und Effektivität der Therapie deutlich eingeschränkt werden<sup>96,97</sup>.

Es existieren mehrere CAR-Generationen, die verschiedene Modifikationen aufweisen, die auf eine Verbesserung der T-Zell-Aktivität, höhere Proliferationsraten und eine längere Persistenz der T-Zellen im menschlichen Körper abzielen. Jedoch blieb die Grundstruktur der ursprünglichen CAR-Generationen weitestgehend unverändert<sup>98</sup>. Diese beinhaltet eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne aus einem variablen Einzelkettenfragment (engl. *single chain variable fragment*, scFv), eine Transmembran-Domäne und, abhängig von der Generation, eine oder mehrere zytoplasmatische Domänen zur Signalweiterleitung und Optimierung der T-Zell-Aktivierung<sup>99</sup>. Der intrazelluläre Anteil aller CAR-Generationen besteht aus der Signal-weiterleitenden CD3 $\zeta$ -Domäne des humanen T-Zell-Rezeptors<sup>100</sup>. CAR-T-Zellen der zweiten Generation, beispielsweise die bereits zugelassenen namens Kymriah® und Yescarta®, die gegen CD19 gerichtet sind, sind mit CARs ausgestattet, die neben der Signal-gebenden CD3 $\zeta$ -Domäne zusätzlich eine co-stimulatorische Domäne aus CD28 bzw. 4-1BB besitzen. Beide CAR-Moleküle garantieren eine effektivere und länger anhaltende T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu CARs ohne co-stimulatorische Domäne<sup>101</sup>. Die dritte Generation von CARs hingegen verfügt über zwei co-stimulatorische Domänen. CAR-T-Zellen mit CARs der vierten Generation, auch TRUCK (engl. *T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing*) genannt, beinhalten zusätzlich ein Gen zur Produktion von Interleukinen wie z.B. IL-12, während es bei Verwendung von CARs der fünften Generation möglich ist, den JAK/STAT-Signalweg über eine zusätzliche  $\beta$ -Kette des IL-2-Rezeptors zu aktivieren<sup>99</sup>.



**Abbildung 8: Die verschiedenen Generationen der CARs.** Die extrazelluläre (EZ) Domäne wird bei allen CAR-Generationen von dem variablen Einzelkettenfragment eines Antikörpers (engl. single chain variable fragment, scFv) gebildet. Das scFv ist über eine Transmembrandomäne mit den intrazellulären (IZ) Domänen verbunden. In der ersten Generation besteht diese lediglich aus der Signal-transduzierenden CD3ζ-Domäne eines humanen T-Zell-Rezeptors. Die zweite Generation verfügt darüber hinaus über eine co-stimulatorische Domäne (aus CD28 oder 4-1BB), die dritte über zwei solcher Domänen. In die vierte Generation wurde ein zusätzliches Gen zur Interleukin-Produktion eingebracht, während die fünfte Generation der CARs zwischen der CD3ζ- und der co-stimulatorischen Domäne die β-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL2RB) enthält, die zur zusätzlichen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges dient. Angelehnt an Gao et al., 2019<sup>102</sup>, erstellt mit BioRender.com.

Die Antigen-bindende Domäne der CARs bindet, ähnlich wie ein Antikörper, direkt Tumor-assoziierte Antigene (TAA) wie Proteine oder Glykane auf der Zelloberfläche von Zielzellen<sup>91</sup>. Diese Art der Erkennung bietet gegenüber TCR den Vorteil, HLA-unabhängig zu sein, sodass der Therapieerfolg nicht durch den *Tumor-Escape-Mechanismus* des HLA-Verlusts beeinträchtigt wird (**2.2.2.1**)<sup>23</sup>. Verlieren die Tumorzellen jedoch das durch die CARs spezifisch gebundene TAA, werden die betroffenen Patienten therapieresistent<sup>91</sup>. Ein weiterer Nachteil von TAA als potentielle Zielantigene im Rahmen von T-Zell-vermittelten Immuntherapien ist deren Expression in gesundem Gewebe, was in erheblichem Maße zu unerwünschten „on-target, off-tumor“-Effekten führen kann<sup>82</sup>. Da die stabile Expression des chimären Antigen-Rezeptors in den T-Zellen des Patienten oft über eine virale Transduktion induziert wird, kann eine potenzielle Onkogenaktivierung mittels Insertionsmutagenese nie vollständig ausgeschlossen werden.

Die häufigste unerwünschte Nebenwirkung der CAR-T-Zell-Therapie ist das CRS (engl. *Cytokine Release Syndrome*)<sup>98</sup>. Die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen wie IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ<sup>98</sup> und GM-CSF durch die CAR-T-Zellen und weiteren Zellen des aktivierten Immunsystems wie Makrophagen und dendritischen Zellen resultiert in einer systemischen Entzündungsreaktion, die mit Fieber, Fatigue, Myalgie, peripheren Ödemen bis hin zum Lungenödem und Organversagen reicht. Diese weist nicht selten Ähnlichkeiten zur potenziell lebensbedrohlichen hämophagozytischen Lymphohistiozytose und dem Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom auf<sup>98</sup>. Weiterhin präsentieren manche Patienten aufgrund der noch nicht vollständig verstandenen Neurotoxizität Symptome wie Tremor, Aphasie, Apraxie, epileptische Anfälle und seltener auch Hirnödeme<sup>98</sup>. Als Möglichkeiten zur Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen werden verschiedene Sicherheitsmechanismen bei CARs

erforscht. Beispielsweise könnten sogenannte Selbsttötungsgene (engl. *suicide genes*) in die T-Zellen eingebracht werden, die die Apoptose der CAR-T-Zellen induzieren können<sup>98</sup>. Als weiteres Sicherheitssystem könnten Patienten mit hyperaktiven CAR-T-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD20 ektopisch überexprimieren, mit Rituximab, einem zugelassenen monoklonalen Antikörper gegen CD20, behandelt werden<sup>98</sup>.

Zukünftig sollen universelle CAR-T-Zellen gesunder Spender zur Verfügung stehen, um Patienten schneller therapieren und auch denjenigen eine CAR-T-Zell-Therapie anbieten zu können, für die autologe T-Zellen aufgrund mangelnder Qualität und Quantität nicht verfügbar sind<sup>98</sup>. Bei einer allogenen CAR-T-Zell-Therapie muss jedoch die Gefahr einer massiven GvHD (engl. *Graft versus Host Disease*) minimiert werden. Mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode ist es möglich, einen Knockout endogener TCR- und MHC-Gene vorzunehmen<sup>101</sup>, wobei bedacht werden muss, dass ein HLA-Klasse I-Verlust diese CARs zu potenziellen Targets endogener NK-Zellen werden lässt<sup>102</sup>. Durch *Genome Editing* eröffnen sich vielerlei Möglichkeiten, durch gezielte Manipulation von Genen den Therapieerfolg zu steigern. So wäre es darüber hinaus möglich, die Anti-Tumor-Antwort der CAR-T-Zellen zu steigern, indem die Gene von Immun-Checkpoints wie PD-1 exzidiert werden<sup>101</sup>.

Auch CSF2RA (CD116) wird als mögliches Ziel-Antigen von CAR-T-Zellen erforscht. Für Patienten mit juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) stellt die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) bisher die einzige kurative Therapie dar<sup>103</sup>. Nakazawa et al. zeigten, dass gegen den GM-CSF-Rezeptor gerichtete CAR-T-Zellen die Proliferation CD34<sup>+</sup> JMML-Zellen inhibierten, ohne die Koloniebildung gesunder CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen zu beeinträchtigen<sup>103</sup>. Eine weitere Studie zeigte antitumorale Effekte von CAR-T-Zellen, die sich sowohl gegen CSF2RA als auch CSF2RB (CD131) richteten, gegen Zellen akuter myeloischer Leukämie. Diese anti-GM-CSF-Rezeptor-CAR-T-Zellen zeigten jedoch unerwünschte Zytotoxizität gegenüber Monozyten, dendritischen Zellen und HSCs, während T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen kaum negativ beeinflusst wurden<sup>82</sup>.

#### 2.5.2.2 TCR-T-Zellen, TCR-like CARs und TCR-CARs

Als Alternative zu CAR-T-Zellen werden TCR-T-Zellen bezüglich ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit als weitere Form des adoptiven T-Zell-Transfers untersucht<sup>104</sup>. Der T-Zell-Rezeptor der TCR-T-Zellen ist ein Heterodimer und besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette sowie einem Signal-weiterleitenden CD3-Komplex. Im Gegensatz zu CARs erkennen TCRs Peptide aus Proteinen jeglicher zellulärer Lokalisation und haben somit eine größere Anzahl möglicher Targetmoleküle<sup>105</sup>. Jedoch erfolgt die Erkennung durch diese TCR-T-Zellen HLA-abhängig. Dies schränkt die Anwendung der TCR-T-Zellen ein, da Spender und Empfänger bestimmte HLA-Allele aufweisen müssen und HLA-Verlust auf Tumoren einen recht häufigen Immunevasions-Mechanismus darstellt<sup>106</sup>. Ein Vorteil der TCR-T-Zellen ist, dass sie zur ihrer Aktivierung geringere Antigen-Dichten auf der Zelloberfläche der Zielzellen als CAR-T-Zellen benötigen, da sie im Gegensatz zu CAR-T-Zellen bereits natürlicherweise über alle an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle verfügen<sup>106</sup>.

Da bei TCR-Zellen die Möglichkeit einer Fehlpaarung (engl. *Mismatch*) zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des endogenen und des exogenen TCRs und somit einer nicht vorhersehbaren Erkennung von Autoantigenen besteht, wird die Wahrscheinlichkeit der Fehlpaarung mithilfe eines CRISPR/Cas9-Knockouts des endogenen TCR verringert<sup>101</sup>.

Um „on-target, off-tumor“-Effekte zu minimieren, ist eine sorgfältige Identifikation geeigneter Zielantigene notwendig. Bevorzugt in Betracht kommen Antigene, die möglichst tumorspezifisch sind, also nicht in gesundem Gewebe exprimiert werden. Zu diesen tumorspezifischen Antigenen gehören v.a. die sogenannten Neoantigene<sup>107</sup>. Neoantigene entstehen durch genetische Mutationen, die oftmals Patienten-spezifisch sind, werden in Form kurzer Peptide über HLA-Moleküle präsentiert und sind so in der Lage, eine Immunreaktion

auszulösen<sup>107</sup>. Neoantigene sind somit in erster Linie Zielstrukturen für TCRs und nicht für CARs.

Klinische Studien zur TCR-T-Zell-Therapie schließen sowohl hämatologische als auch solide Malignome ein. Ziel-Antigene aktueller TCR-T-Zell-Studien sind unter anderem Wilms Tumor 1 in akut myeloischen Leukämien sowie MAGE (engl. *Melanoma Antigen*) und gp100 (Glykoprotein 100) in malignen Melanomen und NY-ESO-1 (engl. *New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1*) in Ovarialkarzinomen, Sarkomen oder NSCLC (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*)<sup>106</sup>. NY-ESO-1 und die MAGE-Familie gehören zu den Tumor/Hoden-Antigenen (engl. *Cancer/Testis-Antigens*), die neben Neoantigenen besonders geeignete Ziel-Antigene für Immuntherapien darstellen, da sie zwar von Hodenkeimzellen, Trophoblasten der Plazenta und verschiedenen Karzinomen, aber nicht oder nur geringfügig von adulten somatischen Zellen exprimiert werden<sup>108</sup>.

Um die Vorteile der beiden Formen des adoptiven Zelltransfers optimal zu nutzen, werden in aktuellen Studien TCR-like (dt. TCR-ähnlich) CARs und TCR-CARs untersucht<sup>107</sup>. TCR-like CARs verfügen über ein extrazelluläres variables Einzelkettenfragment (scFv), welches über MHC-Moleküle präsentierte Peptide erkennt. TCR-CARs binden über ihre von T-Zell-Rezeptoren abgeleiteten variablen Domänen an Peptid-MHC-Komplexe. In laufenden Studien werden mit Rezeptoren gegen MAGE-A3 und NY-ESO-1 zwei bereits bekannte, sehr vielversprechende Antigene als Zielstrukturen untersucht<sup>109</sup>. Zulassungen für Therapien mit TCR-T-Zellen, TCR-like-CARs oder TCR-CARs existieren derzeit noch nicht<sup>108,106</sup>.

#### 2.5.2.3 HLA-unabhängige $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren

Eine weitere Möglichkeit, den Immunevasions-Mechanismus des HLA-Verlusts zu umgehen und eine effektive antitumorale Immunantwort zu generieren, stellen HLA-unabhängige T-Zellen dar, wie sie beispielsweise im Melanommodell Ma-Mel-86 gefunden worden sind **(2.3.3)**. Das therapeutische Potential solcher T-Zellen bzw. ihrer TCRs ist zum jetzigen Zeitpunkt völlig unklar. An erster Stelle muss ausgeschlossen werden, dass HLA-unabhängige TCRs gesunde Körperzellen schädigen, dass es also zu *on-target/off-tumor*-Reaktionen kommt. Der aus dem Blut der Melanompantin isolierte, HLA-unabhängige T-Zell-Rezeptor gegen CSF2RA **(2.3.3)** könnte theoretisch erheblichen Schaden an CSF2RA-exprimierenden, gesunden Körperzellen anrichten. Hier sind im Besonderen myeloische Zellen und insbesondere HSC zu nennen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der *in vitro*-Effekt von T-Zellen, die den zuvor identifizierten CSF2RA-spezifischen, HLA-unabhängigen TCR auf ihrer Zelloberfläche tragen, auf CSF2RA-exprimierende, hämatopoetische Stammzellen untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle/Hersteller
<b>Autoklav (Durchreichautoklav)</b>	Holzner GmbH (Nussloch, Deutschland)
<b>Autoklav</b>	Systec GmbH (Wettenberg, Deutschland)
<b>Bestrahlungsgerät Gammacell 2000</b>	Molsgaarg Medical (Gansloe, Dänemark)
<b>Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II</b>	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
<b>Brucheis-Automat</b>	Ziegran (Isernhagen, Deutschland)
<b>CTL-ImmunoSpot® S6 MICRO Analyzer</b>	C.T.L. Europe GmbH (Bonn, Deutschland)
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator BBD 6620</b>	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
<b>Digitalkamera</b>	Canon Power Shot A640 AiAF (Tokio, Japan)
<b>Gefrierschrank (-80°C) Hera freeze</b>	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, Deutschland)
<b>Kolbenhubpipetten</b>	Eppendorf, STARLAB (Hamburg, Deutschland) Gilson (Middleton, USA)
<b>Kühlschrank</b>	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
<b>Magnetständer/Magnet</b>	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>Multikanalpipetten ErgoOne®</b>	STARLAB (Hamburg, Deutschland)
<b>Pipettierhilfen acu-jet® pro</b>	Brand (Wertheim, Deutschland)
<b>Phasenkontrastmikroskop TS100</b>	Nikon (Alzenau, Deutschland)
<b>Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25</b>	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
<b>Sterilwerkbank Hera safe</b>	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
<b>Stickstoffbank MVE 1400 Series</b>	Chart Biomed (Ballground, USA)
<b>Stickstofftank XL-180</b>	Taylor Wharton (Husum, Deutschland)
<b>Vortexgerät VV 3</b>	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
<b>Wasserbad</b>	GFL (Großburgwedel, Deutschland)
<b>Zentrifuge Rotina 420</b>	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

##### 3.1.2 Plastik- und Glaswaren, Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle/Hersteller
<b>Bechergläser, Kunststoff</b>	Vitlab (Seenheim-Jugendheim, Deutschland)
<b>Einfriercontainer Nalgene® Cryo</b>	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, Deutschland)
<b>Einfrierröhrchen (2 ml)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<b>Einfrierröhrchen (4,5 ml)</b>	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, Deutschland)
<b>Einwegpipetten (2 ml ,5 ml, 10 ml, 25 ml)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<b>Einwegspritzen (3 ml)</b>	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
<b>ELISpot-Platten (Multiscreen®)</b>	Merck Millipore (Eschborn, Deutschland)
<b>FACS-Röhrchen (5 ml)</b>	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

<b>Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<b>Handschuhe (Sempercare®)</b>	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, Österreich)
<b>Kanülen (stumpf, 16 gauge)</b>	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
<b>MACS®-Säulen (MS)</b>	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>MACS® SmartStainer (30 µm)</b>	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>Petrischalen (100 mm)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<b>Petrischalen (35 mm, unbeschichtet)</b>	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
<b>Petrischalen (35 mm)</b>	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
<b>Pipettenspitzen</b>	BD Biociences (Heidelberg, Deutschland)
<b>Pre-Separationsfilter</b>	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>STEMgrid™-6</b>	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
<b>Zählkammer (Fuchs-Rosenthal)</b>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
<b>Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<b>Zellkulturplatten (24-Well)</b>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

### 3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

<b>Reagenz/Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle/Hersteller</b>
<b>3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Dimethylformamid (DMF)</b>	Carl Roth AG (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Dimethylsilfoxid (DMSO)</b>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Essigsäure</b>	Carl Roth AG (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>FACSClean</b>	BD Biociences (Heidelberg, Deutschland)
<b>FACSFlow</b>	BD Biociences (Heidelberg, Deutschland)
<b>FACSRinse</b>	BD Biociences (Heidelberg, Deutschland)
<b>Fötales Kälberserum (FCS)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>HEPES</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Humanserum (HS)</b>	Transfusionszentrale Unimedizin (Mainz, Deutschland)
<b>Hexadimethrinbromid (Polybrene)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Formaldehyd</b>	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Monensin (1000x)</b>	Biologend (San Diego, USA)
<b>Natriumacetat</b>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Phosphate-buffered saline (PBS)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Phosphate-buffered saline (PBS), Pulver</b>	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<b>Terralin®</b>	Schülke&Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)



<b>Trypanblau</b>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Trypsin-EDTA</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Tween®20</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Carl Roth AG (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.1.4 Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Bezugsquelle/Hersteller</b>
<b>Geneticin (G418)</b>	1 mg/ml	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	500 µg/ml	Life Technologies (Darmstadt, Germany)
<b>Puromycin</b>	1 µg/ml	Carl Roth AG (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.1.5 Rekombinante Zytokine

Zur T-Zell-Expansion wurde rekombinantes Interleukin-2 (IL-2) der Firma R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA) verwendet. Die T-Zellen wurden hierzu in mit 600 U/ml IL-2 versetztem Panserin Medium (**3.1.12**) kultiviert.

### 3.1.6 Enzyme

Die Agglutination toter Zellen wurde während des Auftauens (**3.2.3**) von Leukapheresatproben durch die Zugabe von DNase I der Firma Thermo Fisher Scientific (Walham, USA) verhindert. Hierzu wurden die gefrorenen Apheresate zunächst in 10 ml PBS (inkl. 1 U/µl DNase I) aufgenommen und anschließend aufgetaut.

### 3.1.7 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Bezugsquelle/Hersteller</b>
<b>anti-mouse-IgG1-FITC</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-mouse-IgG1-PE</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-human-CD3-PE</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-human-CD4-PE</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-human-CD8-PE</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-human-CD34-PE</b>	FACS	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
<b>anti-human-CSF2RA-FITC (Klon REA211)</b>	FACS	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>anti-human-CSF2RA-PB</b>	FACS	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
<b>anti-mouse-TCR-α-chain constant region-FITC (mTRAC)</b>	FACS	OriGene Technologies GmbH (Herford, Germany)
<b>anti-human-CD107a-PE</b>	CD107a-Degranulations-Assay	BioLegend (San Diego, USA)
<b>anti-human-IFN-gamma Mab1-D1K</b>	ELISpot-Assay	Mabtech AB (Nacka, Schweden)

<b>anti-human-IFN-gamma Mab7-B6-1 (biotinyliert)</b>	ELISpot-Assay	Mabtech AB (Nacka, Schweden)
<b>OKT3 (anti-CD3)</b>	ELISpot-Assay, T-Zell-Expansion	ATCC (Wesel, Deutschland)
<b>W6/32 (anti-HLA-Klasse I)</b>	ELISpot-Assay	Dr. P. Parham (Departments of Structural Biology and Microbiology and Immunology, Stanford University Stanford, USA)

### 3.1.8 MicroBeads

Zur Separation von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> Zellen wurden magnetische anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD34 MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet. Durch magnetische Zellseparation (**3.2.4, 3.2.5**) wurden dann CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus eingefrorenen, mit Stammzellen angereicherten Leukapheresatproben (**3.1.11.5**) isoliert.

### 3.1.9 Lösungen und Puffer

<b>Lösungen/Puffer</b>	<b>Zugaben</b>	<b>Verwendung</b>
<b>Acetatpuffer</b>	4,6 ml Essigsäure 11,0 ml Natriumacetat (0,2 N) 46,9 ml doppelt-destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	ELISpot-Assay
<b>AEC-Komplex</b>	1 Tablette 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC) 2,5 ml N, N-Dimethylformamid 47,5 ml Acetatpuffer (filtriert, 0,22 µm) steril filtriert (0,22 µm) und vor Gebrauch mit 25 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> versetzt	ELISpot-Assay
<b>Avidin-Peroxidase-Komplex</b>	1 Tropfen Vectastain-Reagenz A 1 Tropfen Vectastain-Reagenz B 0,1 ml Tween®20 (10%) 10,0 ml PBS	ELISpot-Assay
<b>EDTA 0,5 M</b>	18,6 g EDTA 100,0 ml ddH <sub>2</sub> O	Zellkultur
<b>FACS-Puffer</b>	500 ml PBS 2,5 g BSA	FACS
<b>FACS-Fixans</b>	1,35 ml 37% Fomaldehyd 50 ml PBS	FACS
<b>MACS-Puffer</b>	500 ml PBS, 2,5 g BSA 0,29 g (2 mM) EDTA	Magnetische Zellseparation
<b>Natriumacetat 0,2 N</b>	16,4 g Natriumacetat 1,0 l dH <sub>2</sub> O	
<b>PBS</b>	95,5 g PBS-Pulver 10 l dH <sub>2</sub> O	
<b>Trypanblau 0,2%</b>	1,0 g Trypanblau 500 ml dH <sub>2</sub> O	Zellzählung
<b>Trypanblau (Gebrauchslösung)</b>	375 ml 0,2 % Trypanblau	Zellzählung
<b>Tween®20 10%</b>	500 ml Tween®20 500 ml PBS	ELISpot-Assay

## 3.1.10 Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Zur Verfügung gestellt von
pMX_IRES_Puro_Dest#35	Catherine Wölfel (8.1)
pMX_IRES_Neo_Dest#9	Catherine Wölfel (8.1)

## 3.1.11 Zellen und Zelllinien

## 3.1.11.1 NOMO-1

Die Zelllinie NOMO-1 (DMSZ-Nummer: ACC 542) entstammt dem Knochenmark einer 31-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M5a) während des zweiten Rezidivs. NOMO-1 zeichnen sich durch eine natürlicherweise hohe Expression von CSF2RA auf ihrer Zelloberfläche aus (4.2.44.2.4). NOMO-1 stellt innerhalb dieser Arbeit die einzige Target-Zelllinie dar, deren CSF2RA-Expression nicht durch retrovirale Transduktion artifiziell erzeugt oder gesteigert wurde. Laut DMSZ weisen NOMO-1 Zellen keine Expression von CD34 auf<sup>110</sup>.

## 3.1.11.2 K562

Die Zelllinie K562 wurde aus Zellen einer 53-jährigen Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in der Blastenkrise generiert. Aufgrund der geringen Differenzierung dieser Zellen lässt sich ihr Ursprung nicht genau identifizieren<sup>111</sup>. Die hier verwendeten K562-Zellen wurden durch retrovirale Transduktion mit den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD83 zur T-Zell-Aktivierung<sup>30,112</sup> ausgestattet (Marc Pannenbeckers, unveröffentlichte Daten) und waren zusätzlich HLA-Klasse I- und II-negativ (K562\_CD80.83\_KO<sup>B2M/CIIITA</sup>). Letzteres wurde durch TALEN (engl. *Transcription activator-like effector nuclease*) -induzierte *Frameshift*-Mutationen beider  $\beta 2M$ - und *CIIITA*-Allele herbeigeführt (Marc Pannenbeckers und Christoph Doppler, unveröffentlichte Daten). Im Folgenden werden sie als K562\_KO und, sofern die Zelllinie mit dem humanen Antigen CSF2RA transduziert worden war, als K562\_KO/CSF2RA bezeichnet.

## 3.1.11.3 Ma-Mel-86b

Die Melanomzelllinie Ma-Mel-86b wurde aus einer Lymphknotenmetastase einer 34-jährigen Patientin mit malignem Melanom zwei Jahre nach Erstdiagnose im Krankheitsverlauf etabliert. Diese Zellen tragen aufgrund fehlender  $\beta 2$ -Mikroglobulin ( $\beta 2M$ ) -Expression keine HLA-Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche<sup>113</sup>, jedoch natürlicherweise CSF2RA und TRP2 (engl. *Tyrosinase-Related Protein 2*)<sup>114</sup>. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Prof. A. Paschen (Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Durch einen TALEN-vermittelten Knockout von *CIIITA*, einem essenziellen Transkriptionsfaktor für die Expression von HLA-Klasse II-Molekülen<sup>115</sup>, wurden HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-defiziente Ma-Mel-86b Zellen generiert. Diese HLA-Klasse I- und II-negativen Zellen wurden zusätzlich mittels retroviraler Transduktion eines bicistronischen Konstrukts für die simultane CD80- und CD83-Expression ausgestattet. Weiterhin wurden diese sogenannten Ma-Mel-86b\_CD80.83\_KO<sup>CIIITA</sup> Zellen zusätzlich mit den humanen Zielantigenen CSF2RA oder TRP2 für deren Überexpression ausgestattet<sup>116</sup>. Sowohl der *CIIITA*-Knockout als auch die Transduktion der Zellen mit CD80, CD83, CSF2RA und TRP2 wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit von Patrick Derigs und Catherine Wölfel durchgeführt. Ma-Mel-86b\_CD80.83\_KO<sup>CIIITA</sup> Zellen wurden innerhalb dieser Arbeit zur spezifischen Stimulation der HLA-Klasse I-unabhängigen T-Zellen, transduziert mit einem chimärisierten T-Zell-Rezeptor gegen CSF2RA (T-Zellen/cTCR- $\alpha$ CSF2RA) oder dem für dieses Projekt irrelevanten HLA-Klasse I-unabhängigen cTCR gegen TRP2 (T-Zellen/cTCR- $\alpha$ TRP2), verwendet. Nachfolgend werden diese Zellen Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 genannt.

### 3.1.11.4 Phoenix-AMPHO

Diese Zelllinie ist eine Retrovirus-Verpackungszelllinie der zweiten Generation und basiert auf der 293T-Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die durch Transfektion sogenannter „Hilfsvektoren“ (3.1.10) zur Produktion von Struktur- und amphotropen Hüllproteinen sowie der retroviralen Polymerase befähigt wurde<sup>117</sup>. Phoenix-AMPHO-Zellen zeichnen sich durch ihre hohe Transfizierbarkeit und der Produktion einer großen Zahl viraler Partikel innerhalb weniger Tage aus<sup>118</sup>. Zur Verfügung gestellt wurde die Zelllinie freundlicherweise von Dr. H. Echchannaoui (Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz).

### 3.1.11.5 Leukapheresatproben

Die Leukapheresatproben der Spender 1, 2 und 3, aus denen die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellen und CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen extrahiert wurden, wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. E. Wagner-Drouet (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz). Zunächst wurden den Spendern 1, 2 und 3, nach einer Vorbehandlung mit G-CSF, mit CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen angereicherte Blutproben entnommen. Aus diesen in der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Stammzellapheresate hergestellt. Im Anschluss wurden aus den für die Forschung zur Verfügung gestellten Proben der Stammzellapheresate mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMCs (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isoliert, in dem Medium X Vivo 15 (4% Humanserumalbumin, 1 µl/ml Heparin und 10% DMSO) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Sie entstammen zwei gesunden, allogenen Stammzellspendern sowie einem erkrankten, autologen Stammzellspender.

### 3.1.12 Zellkulturmedien

Für die Kultivierung und Kryokonservierung der T-Zellen und anderer Zelllinien wurden verschiedene Zellkulturmedien und Einfriermedien verwandt. Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Medium	Zugaben	Verwendung	Bezugsquelle/Hersteller
<b>DMEM</b> <sup>complete</sup>	2mM L-Glutamin 10% FCS (hitzeinaktiviert, 45 min bei 56°C) 500 U/ml Penicillin 500µg/ml Streptomycin 25 mM HEPES 1x Nicht- essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Phoenix-AMPHO	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Einfriermedium</b>	FCS (hitzeinaktiviert, 45 min bei 56°C) 10% DMSO	alle verwendeten Zellen	
<b>IMDM</b>	2% FCS (hitzeinaktiviert, 45 min bei 56°C)	Leukapheresatproben	Lonza (Basel, Schweiz)
<b>MethoCult™ GF H84444</b>		Koloniebildungstest	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)

<b>Panserin 413</b>	10% Humanserum 500 U/ml Penicillin 500 µg/ml Streptomycin	T-Zellen	PAN Biotech GmbH (Passau, Deutschland)
<b>RPMI 1640<sup>complete</sup> L-Glutamin</b>	10% FCS (hitzeinaktiviert, 45 min bei 56°C) 500 U/ml Penicillin 500 µg/ml Streptomycin	NOMO-1, K562, Ma- Mel-86b	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
<b>RPMI<sup>+</sup> 1640</b>	10% FCS (hitzeinaktiviert, 45 min bei 56°C)	ELISpot-Assay	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Um Kontaminationen der in dieser Arbeit verwandten Zellen auszuschließen, wurden diese zu jeder Zeit steril unter einer Sicherheitswerkbank kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5 % und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen oder 24-Well-Platten kultiviert. Die Subkultivierung wurde zweimal wöchentlich vorgenommen, indem die Suspensionszelllinien K562\_KO, K562\_KO/CSF2RA und NOMO-1 in einer Konzentration von 0,2x10<sup>6</sup> Zellen/ml und von den Adhäsionszelllinien Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 0,5-1x10<sup>6</sup> Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> oder 2x10<sup>6</sup> Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche in RPMI<sup>complete</sup> ausgesät wurden. Adhärenz Zellen wurden zur Kultivierung, je nach Flaschengröße, mit 2-5 ml PBS (0,05 % EDTA) für etwa 5 Minuten inkubiert, mechanisch durch Klopfen abgelöst und in 10 ml RPMI<sup>complete</sup> aufgenommen. Phoenix-AMPHO-Zellen wurden im Gegensatz zu allen anderen Zellen in DMEM-Medium kultiviert und durch die Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst. T-Lymphozyten wurden in der Konzentration 2x10<sup>6</sup> Zellen/2 ml Panzerin 413 (+10 % HS, 1 % Penicillin/Streptomycin) in 24-Well-Platten ausgesät und alle zwei bis drei Tage 1:2 verdünnt. Einmal pro Woche wurden 1,5x10<sup>6</sup> T-Zellen mit 0,1x10<sup>6</sup> bestrahlten (10000 Rad) Ma-Mel-86b\_KO und 600 U/ml IL-2 stimuliert. Die Melanomzelllinie wurde zuvor retroviral mit Expressionskonstrukten der cTCR-spezifischen Antigene CSF2RA (Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA) oder TRP2 (Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA) retroviral transduziert. Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA, Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 sowie die mit den HLA-Klasse I-unabhängigen T-Zell-Rezeptoren gegen CSF2RA und TRP2 ausgestatteten T-Zellen wurden mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert, K562\_KO/CSF2RA mit 1 mg/ml G418.

### 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Zur Zellzählung wurden alle kultivierten Zellen, sofern notwendig, zunächst abgelöst und dann für 5 Minuten bei 1800 rpm (engl. *rounds per minute*) zentrifugiert, bevor das Zellpellet resuspendiert und die Zellen gezählt wurden.

Die Zellzahl wurde mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops und einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Um die vitalen von den toten Zellen unterscheiden zu können, wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, welcher aufgrund ihrer nicht-intakten Zellmembranen nur in tote Zellen eindringt und diese blau anfärbt. Je 20 µl der Zellsuspensionen wurden im Verhältnis 1:2 mit der Trypanblau-Gebrauchslösung (**3.1.3**) verdünnt, in die Zählkammer gegeben und die vitalen Zellen nach 2 Minuten mit Hilfe der folgenden Formel ausgezählt.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen pro Großquadrat}}{0,2 \text{ mm (Kammertiefe)}} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 1000$$

### 3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach Einstellung der gewünschten Zellzahl in 1 ml des Einfriermediums (FCS + 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) in 2 ml Kryoröhrchen der Firma Greiner. Hierfür wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, RT (Raumtemperatur)), dann sämtlicher Überstand entfernt und die Zellpellets anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Die Leukapheresatproben wurden in dem Medium X Vivo 15 (4% Humanserumalbumin, 1 µl/ml Heparin und 10% DMSO) eingefroren. Um eine möglichst hohe Überlebensrate der eingefrorenen Zellen nach erneutem Auftauen zu erreichen, wurden die Einfrieröhrchen zügig in Isopropanol-befüllte Kryoboxen überführt und zunächst bei -80°C gelagert, wodurch ein schonendes Abkühlen der Zellen um 1°C/Minute sichergestellt werden

konnte. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen nach 24 Stunden in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank in der Gasphase eingelagert.

Auftauen: Aufgrund der Zelltoxizität des DMSO bei Raumtemperatur wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C angetaut und rasch mit 10 ml RPMI<sup>complete</sup> verdünnt. Vor der Zellzählung (3.2.2) und –kultivierung (3.2.1) wurden die Zellen zweimal in 10 ml RPMI<sup>complete</sup> gewaschen (1800 rpm, 5 Minuten, RT). Im Gegensatz dazu wurden T-Zellen aus den Leukapheresaten mit Panserin 413 (+10% HS, 1 % Penicillin/Streptomycin) und die Leukapheresate (vor der CD34-Isolation) mit IMDM (+10% FCS) gewaschen. Letztere Präparate wurden mit 1 mg/ml DNase versetzt (3.1.6), gemischt und für 8 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert.

### 3.2.4 Isolation humaner peripherer Blutlymphozyten aus den Leukapheresatproben

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden aus den Leukapheresatproben der Spender 1, 2, und 3 durch anti-CD4- und anti-CD8-MicroBeads (3.1.8) mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Am Protokoll der Firma Miltenyi Biotec wurden folgende Änderungen vorgenommen:

Zunächst wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer (MACS, engl. *Magnetically Activated Cell Sorting*) gewaschen, in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und über einen MACS SmartStrainer-Zellfilter (30µm) in ein 50 ml Falcon gegeben. Nach Zugabe von weiteren 5 ml MACS-Puffer wurden die Zellen gezählt (3.2.2) und zentrifugiert. Zu 10x10<sup>6</sup> Lymphozyten/500 µl MACS-Puffer wurden je 15 µl anti-CD8- oder 20 µl anti-CD4-MicroBeads hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen, nicht gebundene MicroBeads bei 1800 rpm und RT über 5 min herausgewaschen und das Zellpellet mit 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Währenddessen wurde die MS Separationssäule durch Zugabe von 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die mit den MicroBeads inkubierte Zellsuspension in 1 ml Portionen auf die Separationssäule gegeben. Schließlich wurde die Säule dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Die negative Zellfraktion wurde in einem 15 ml Falcon gesammelt und ausgezählt. Nun wurde die Säule aus dem Magnetständer herausgenommen und in ein neues 15 ml Falcon überführt. Mithilfe des zugehörigen Stempels wurden die isolierten Zellen zunächst langsam, dann schnell in 2 ml Panserin (10% Humanserum) von der Säule eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die isolierten Zellen gezählt (3.2.2), kultiviert (3.2.1) und die Reinheit der Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie (3.2.7) bestimmt.

### 3.2.5 Isolation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus den Leukapheresatproben

Die Isolation CD34-positiver Zellen erfolgte aus aliquotierten Leukapheresatproben (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med Eva Wagner-Drouet, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Mainz). Die Proben wurden zuvor aus mit CD34-positiven Zellen angereicherten Leukapheresaten zweier gesunder Stammzellspender und eines erkrankten Stammzellspenders mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation und der Trennlösung Ficoll gewonnen (3.1.11.5). Die Spender waren 4 Tage vor der Stammzellapherese mit Neupogen®, einem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), behandelt worden, um hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren, woraus sie dann gewonnen und angereichert wurden.

Die Leukapheresatproben der drei Spender waren in flüssigem Stickstoff gelagert worden und wurden für die Isolation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen frisch aufgetaut (3.2.3). Die Separation der CD34<sup>+</sup> Zellen wurde mithilfe des CD34-MicroBead-Kits der Firma Miltenyi Biotec nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Lediglich abgeändert wurde das Volumen, worin die mit anti-CD34 MicroBeads-markierten Zellen auf die MACS-Säulen gegeben wurde, sowie das Elutionsvolumen. Ersteres wurde von 500 µl auf 3 ml und das Elutionsvolumen von 1 ml auf 2 ml erhöht. Vor der weiteren Verwendung der angereicherten CD34<sup>+</sup> Zellen wurde der Erfolg der Isolation durchflusszytometrisch überprüft (4.2.3). Die mithilfe der anti-CD34

MicroBeads gewonnenen Zellen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen werden im Folgenden als CD34<sup>+</sup> Zellen bezeichnet.

### 3.2.6 Retrovirale Transduktion humaner Zellen

#### 3.2.6.1 Transduktion humaner T-Zellen mit anti-CSF2RA und anti-TRP2 T-Zell-Rezeptor-Konstrukten

Aufgrund der möglichen Freisetzung von viralen Partikeln frisch transduzierter Zellen erfolgte deren Kultivierung bis 2 Wochen nach retroviraler Transduktion in einem Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 2, danach in einem der Sicherheitsstufe 1. Für die retrovirale Transduktion der T-Zellen (**3.2.6.1**) wurden bicistronische Expressionskonstrukte verwendet (Tim Schäufele, unveröffentlichte Daten, **8.1**, **8.2**), die für die simultane Expression beider T-Zell Rezeptorketten (alpha und beta) kodieren und zusätzlich ein Puromycin-Resistenzgen zur späteren Zelselektion beinhalten. Innerhalb eines vorangegangenen Projektes war die Chimärisierung der T-Zell-Rezeptoren erfolgt, indem die humanen konstanten Domänen der alpha- und beta-Ketten durch homologe murine Sequenzen ersetzt worden waren, um Fehlpaarungen endogener und exogener T-Zell-Rezeptoren zu vermeiden<sup>6</sup>. Die Trennung der alpha- und beta-T-Zell-Rezeptorketten während der Translation innerhalb der transduzierten Zielzellen wurde durch ein zwischen beide Gensequenzen eingefügtes P2A-Element ermöglicht. Basierend auf vorangegangenen Experimenten (Masterarbeit Tim Schäufele, AG Wölfel, 2019), die eine erhöhte cTCR (chimärer T-Zell-Rezeptor) -Expression bei einer  $\beta$ -P2A- $\alpha$ -Orientierung der cTCR-Konstrukte nachweisen konnten, wurden die T-Zellen der drei Spender mit ebendiesen cTCR-Konstrukten ausgestattet.

Im ersten Schritt (Tag 0) erfolgte die Transfektion der Phoenix-AMPHO-Zellen, welche für jede Transfektion gesondert aufgetaut und in der Konzentration  $0,8 \times 10^6$  Zellen/13ml DMEM<sup>complete</sup> (**3.1.12**) in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät und anschließend für drei Tage kultiviert wurden (**3.2.1**). Darauffolgend wurden jeweils  $1,2 \times 10^6$  Phoenix-AMPHO Zellen abgelöst (**3.2.1**) und in eine 10 cm Zellkultur-Petrischale in 8 ml DMEM<sup>complete</sup> überführt. Am vierten Tag wurde die Transfektion vier Stunden nach einem Mediumwechsel mit DMEM<sup>complete</sup> (**3.1.12**) durchgeführt. Dafür wurden 800  $\mu$ l serumfreies DMEM Medium mit 15  $\mu$ l FuGENE für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ g des für den jeweiligen, exogenen T-Zell-Rezeptor ( $\alpha$ -CSF2RA oder  $\alpha$ -TRP2) kodierenden Vektors pMX-IRES-Puro-DEST#35 (**3.1.10**) zusammen mit 5  $\mu$ g der beiden „Helferplasmide“ pHIT und pCOLT-GALV hinzugefügt. pHIT kodiert die Expression von Polymerase- und Strukturproteinen des Moloney Mausleukämievirus, während pCOLT-GALV für die Expression amphotropher Hüllproteine des Gibbonaffenleukämievirus kodiert<sup>18</sup>. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transduktions-Mixtur vorsichtig auf die Phoenix-AMPHO-Zellen getropft. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen und durch 6,5 ml RPMI<sup>complete</sup> ersetzt. Dieser die viralen Partikel enthaltende Überstand wurde dann am Folgetag für die retrovirale Transduktion der T-Zellen benutzt.

Die zuvor isolierten T-Zellen (**3.2.4**) wurden am Tag der Phoenix-AMPHO-Transfektion für die spätere retrovirale Transduktion vorbereitet. Hierzu wurden  $2 \times 10^6$  T-Zellen/Well in einer 24 Well-Zellkulturplatte in jeweils 2 ml Panzerin (10% Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 30 ng/ml OKT3, 600 U/ml IL-2) ausgesät.

Der retrovirale Überstand wurde dann an Tag 2 nach Transfektion der Phoenix-AMPHO-Zellen zunächst gesammelt und für 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert, um mögliche Zellreste zu entfernen. Danach wurden jeweils  $1,5 \times 10^6$  T-Zellen mit 1 ml des viralen Überstandes, 4  $\mu$ g/ml Polybrene und 600 U/ml IL-2 versetzt und in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Vor der Inkubation der Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht erfolgte eine Zentrifugation der Platte mit 2000 rpm ohne Bremse bei 32°C für 90 Minuten.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die einmalige und cTCR-spezifische Stimulation der transduzierten T-Lymphozyten mit bestrahlten Ma-Mel-86b Tumorzellen, die nach retroviraler



Transduktion entweder TRP2 oder CSF2RA auf ihrer Zelloberfläche überexprimierten **(3.1.11.3)**. Pro Well wurden  $1,5 \times 10^6$  cTCR-transgene T-Zellen spezifisch mit  $0,1 \times 10^6$  Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 in 2 ml Panserin (10 % Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 600 U/ml IL-2) stimuliert. Die T-Zellen wurden zusätzlich mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Puromycin selektioniert. Die mit den chimärisierten T-Zell-Rezeptoren gegen CSF2RA oder TRP2 transduzierten T-Zellen der Spender werden im Folgenden allgemein als CSF2RA- und TRP2-cTCR-T-Zellen oder CD3-, CD4, oder CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA bzw.  $-\alpha$ TRP2 bezeichnet.

Die Oberflächenexpression der beiden T-Zell-Rezeptoren wurde am fünften Tag nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. Sofern die cTCR-Expression oberhalb von 50% lag, wurden die Zellen weiter kultiviert und selektioniert. Zwischen dem zehnten und dem 13. Tag nach Transduktion wurde die cTCR-Expression erneut verifiziert. Anschließend wurde die Wirkung der transgenen T-Zellen auf CD34<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe eines IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, eines CD107a-Degranulations-Assays und eines Koloniebildungstests analysiert.

#### 3.2.6.2 Transduktion der CML-Zelllinie K-562\_CD80.83-KO<sup>B2M/CIITA</sup> mit humanem CSF2RA

Die Transduktion der K-562\_CD80.83-KO<sup>B2M/CIITA</sup> Zellen **(3.2.6.2)** mit der humanen alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors (CSF2RA) folgte einem ähnlichen Procedere wie die der T-Zellen. Phoenix-AMPHO-Zellen **(3.1.11.4)** wurden mit dem Expressionsvektor pMX\_IRES\_Neo\_Dest#9\_CSF2RA **(3.1.10)** und den Helferplasmiden transfiziert. 2,5 ml des retroviralen Überstandes wurden mit  $4 \mu\text{g/ml}$  Polybrene versetzt und auf  $1 \times 10^6$  K-562\_CD80.83-KO<sup>B2M/CIITA</sup> Zellen gegeben. Diese wurden in eine 6-Well-Platte überführt und für 90 Minuten mit 2000 rpm ohne Bremse bei 32°C zentrifugiert und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit 5 ml RPMI<sup>complete</sup> ersetzt und die Zellen mit  $1 \text{ mg/ml}$  G418 selektioniert. Die Effizienz der Transduktion wurde nach 5 Tagen mittels Durchflusszytometrie **(3.2.7)** bestimmt. Die retroviral transduzierten K562 Zellen werden nachfolgend K562\_KO/CSF2RA genannt, nicht CSF2RA-transduzierte Zellen K562\_KO.

#### 3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) genannt, ermöglicht die Sortierung und Analyse verschiedenster Zellpopulationen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, die mit Hilfe von spezifischen Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gebunden und angefärbt werden.

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen verschiedener Zellpopulationen wurden zunächst pro FACS-Röhrchen  $0,1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml FACS-Puffer **(3.1.9)** gegeben und für 5 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der überschüssige Puffer mittels Dekantierens verworfen war, wurden die Zellpellets mit einem Vortexmischer aufgelockert und mit spezifischen farbstoffgekoppelten Antikörpern **(3.1.7)** für 30 Minuten bei 4°C oder für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, dieser dekantiert, und schließlich die Zellen mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Fixans fixiert **(3.1.9)**. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C und im Dunkeln aufbewahrt. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der Antikörper und zur leichteren Einstellung der Gates bei der Auswertung der Messungen wurden für jedes Experiment Isotyp-gefärbte, ungefärbte und bei Mehrfachfärbungen einzeln gefärbte Ansätze, sogenannte FMO (Fluorescence Minus One) -Kontrollen, mitgeführt.

Gemessen wurde die Oberflächenexpression der Marker mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Canto II der Firma BD mit der Software FACS Diva. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo (Version v7.6.5, FlowJo, LLC, Ashland, USA).

### 3.2.8 IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay

Die Aktivierung cTCR-transduzierter T-Zellen wurde im Zuge dieser Arbeit mit Hilfe von IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma) -ELISpot-Assays (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Spot-Assay*) analysiert. Durch die antikörpervermittelte spezifische Bindung des von aktivierten T-Zellen sezernierten IFN- $\gamma$  konnte eine mögliche T-Zell Aktivierung einerseits nachgewiesen und andererseits quantifiziert werden<sup>119</sup>. Zunächst wurde hierzu ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch humanes Interferon- $\gamma$  bindet (**3.1.7**), an die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran der ELISpot-Platten (**3.1.2**) gebunden. Das nur nach spezifischer Antigenerkennung sezernierte IFN- $\gamma$  aktivierter T-Zellen wurde so zunächst an der Membran immobilisiert und nach der Entfernung der Zellen durch einen weiteren, biotinylierten anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper (**3.1.7**) gebunden. Die folgende Zugabe einer Avidin-gekoppelten Peroxidase ermöglichte zusammen mit dem Substrat AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) die spezifische Quantifizierung des zuvor sezernierten IFN- $\gamma$  durch Bildung rotgefärbter Spots auf der Membran.

Zu Beginn des Assays wurde die PVDF-Membran der ELISpot-Platte mit 20  $\mu$ l/Well 35 %-iger Ethanollösung aktiviert und anschließend dreimal mit 150  $\mu$ l/Well sterilem PBS gewaschen. Danach wurden 500 ng des Primärantikörpers (Mab1-D1K) in 50  $\mu$ l PBS gegeben, in die jeweiligen Wells transferiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Belegung der ELISpot-Platten mit den Testansätzen wurden die ungebundenen Primärantikörper dreimal mit 150  $\mu$ l/Well PBS abgewaschen und die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran anschließend mit 100  $\mu$ l/Well Serum-haltigem Medium RPMI<sup>+</sup>(RPMI + 10 % FCS) blockiert (30 min, RT). Nun wurden 30000-50000 Zellen der Targets in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>/Well ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Effektorzellen wurden zunächst in RPMI<sup>+</sup> gewaschen und dann in 50  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup>/Well (inkl. 250 IU/ml IL-2) ausplattiert. Als Effektorzellen dienten 2000 T-Zellen, die zuvor mit HLA-Klasse I-unabhängigen T-Zell-Rezeptoren gegen CSF2RA oder TRP2 ausgestattet (**3.2.6.1**) und dann 12 Tage vor dem Assay mit der Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 spezifisch stimuliert worden waren (**3.1.11.3**). Die Zellzahl bezieht sich auf cTCR<sup>+</sup> T-Zellen, die unmittelbar vor dem Test durchflusszytometrisch nachgewiesen wurden (**3.2.7**). Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die PVDF-Membranen zunächst sechsmal mit PBS mit 0,05 % Tween20 (**3.1.9**) gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 60  $\mu$ l/Well des zu 2  $\mu$ g/ml PBS/0,5 % BSA (**3.1.9**) verdünnten Sekundärantikörpers (Mab7-B6-1-Biotin) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Stunden inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex hergestellt, der dann nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten und erneutem sechsmaligem Waschen der Wells mit PBS (0,05 % Tween20) zu je 100  $\mu$ l/Well auf die Platte gegeben wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nun wurde die Platte zuerst dreimal mit PBS/0,05 % Tween20, dann dreimal mit PBS gewaschen. Die Testentwicklung erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ l/Well AEC-Substratlösung (**3.1.9**). Die Substratumsetzung wurde nach etwa zehn Minuten durch Spülen der Wells mit fließendem Leitungswasser beendet. Im letzten Schritt wurden die Membranen von der Platte abgelöst und anschließend für 20 Minuten bei 50°C getrocknet. Die maximale Spotanzahl für diejenigen Wells, innerhalb derer aufgrund sehr starker IFN- $\gamma$ -Sekretion die Spots nicht einzeln ausgewertet werden konnten, wurde auf 1000 festgelegt. Jeder Testansatz wurde als Doppelwert ausplattiert. Das Testergebnis wurde mithilfe des CTL-ImmunoSpot®-Gerätes analysiert (**3.1.1**).

### 3.2.9 Antikörperblockade der T-Zellen

Um die T-Zell-Antworten im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay (**3.2.8**) genauer charakterisieren zu können, wurde der HLA-Klasse I-spezifische Antikörper W6/32<sup>119</sup> (**3.1.7**) in einer Konzentration von 1 mg/ml in 5  $\mu$ l/Well eingesetzt. Eine Blockade durch W6/32 würde auf *off-target*, HLA-restringierte Antigenerkennung durch die endogenen TCRs hinweisen. Auf diese Weise konnte überprüft werden, inwiefern die IFN- $\gamma$ -Sekretion auf den HLA-Klasse I-unabhängigen T-Zell-Rezeptor zurückzuführen war. Der Antikörper wurde aus Hybridomüberständen aufgereinigt.

### 3.2.10 CD107a-Degranulations-Assay

Der CD107a-Degranulations-Assay ermöglichte die indirekte Bestimmung der lytischen Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten<sup>120</sup>. Deren Fähigkeit zur zytotoxischen Wirkung wurde indirekt durch die durchflusszytometrische Quantifizierung der Oberflächenexpression **(3.2.7)** des Moleküls CD107a, auch LAMP-1 (engl. *Lysosomal Associated Membrane Protein 1*) genannt, gemessen. CD107a ist ein Transmembranprotein lysosomaler, lytischer Granula in T-Lymphozyten und NK-Zellen. Während des Degranulationsprozesses verschmilzt die äußere Membran dieser Granula mit der Plasmamembran der lytischen Zellen, sodass die CD107a-Moleküle auf deren Zelloberfläche exprimiert werden und somit als Marker für Zytotoxizität durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können<sup>121</sup>.

Zu Beginn des CD107a-Degranulations-Assays wurden die cTCR-transgenen T-Zellen (nachfolgend auch Effektorzellen oder Effektoren genannt), zwölf Tage nach spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA, einmal in RPMI<sup>complete</sup> gewaschen. Die eingesetzten Targets wurden ebenfalls einmal in RPMI<sup>complete</sup> gewaschen. Danach wurden je  $0,1 \times 10^6$  T-Zellen zusammen mit  $0,1 \times 10^6$  Zellen der verschiedenen Targets in jeweils 100  $\mu$ l RPMI<sup>+</sup> aufgenommen (Effektor: Target-Verhältnis 1:1) und in einem FACS-Röhrchen mit 1x Monensin **(3.1.3)** und 1  $\mu$ l des 1:10 verdünnten, PE-markierten Antikörpers gegen den Oberflächenmarker CD107a **(3.1.7)** versetzt. Monensin wirkt der Azidifizierung intrazellulärer Kompartimente entgegen und verhindert damit die Degradierung erneut endozytierter CD107a-Antikörperkomplexe. Anschließend wurde die Effektor-Target-Suspension für sechs<sup>120</sup> statt 24 Stunden<sup>6</sup> bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> co-inkubiert **(4.1)**. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmalig in FACS-Puffer gewaschen und mit 1  $\mu$ l FITC-markiertem anti-mTRAC Antikörper **(3.1.7)** gefärbt. Schließlich wurden die gefärbten Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und in 200  $\mu$ l Formaldehyd (1%) fixiert, bevor die Expression der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert wurde. Auf die im Protokoll angegebene 30-minütige Vorinkubation der T-Zellen<sup>6</sup> mit dem Antikörper gegen CD107a wurde verzichtet<sup>120</sup>. Zum Nachweis der prinzipiellen Fähigkeit zur Degranulation wurde den T-Zellen 50 ng/ml Phorbol-Myristat Azetat (PMA) und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin zugegeben. Als Negativkontrolle der cTCR-transgenen T-Zellen dienten Testansätze mit Targets, die das T-Zell-Rezeptor-spezifische Antigen nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Zusätzlich wurde auch die spontane, also in Abwesenheit eines spezifischen Targets messbare, CD107a-Expression bestimmt. Die Anzahl der T-Zellen bezieht sich auf cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup>- und cTCR- $\alpha$ TRP2<sup>+</sup> T-Zellen, deren cTCR-Expression unmittelbar vor dem CD107a-Degranulations-Assay mittels FACS-Färbung nachgewiesen wurde. Zur Einstellung der Gates in der durchflusszytometrischen Analyse der Degranulations-Assays wurden sowohl Isotyp-Kontrollen der Antikörper als auch FMO (engl. *Fluorescence Minus One*) -Kontrollen mitgeführt. Bei FMO-Kontrollen werden die Zellen mit allen eingesetzten Fluorophoren außer einem gefärbt, um deren Fluoreszenzstreuung in andere Kanäle besser abgrenzen zu können<sup>122</sup>.

### 3.2.11 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest, auch Colony-Forming Unit (CFU)-Assay, oder Methylcellulose-Assay genannt, ist ein funktioneller Test für hämatopoetische Vorläuferzellen, durch welchen deren Proliferationsfähigkeit und Differenzierungsverhalten analysiert werden kann. Etabliert ist dieser Test in Zentren für hämatopoetische Stammzelltransplantation zur Gewährleistung der Transplantation möglichst vieler (zuvor durchflusszytometrisch nachgewiesener) und qualitativ hochwertiger CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Der Vorteil gegenüber einer reinen Phänotypisierung der Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker ist, dass in Koloniebildungstests die funktionalen Eigenschaften der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, also Proliferation und Differenzierung, bestimmt werden können<sup>123</sup>. Mithilfe dieser Qualitätskontrolle kann die Wahrscheinlichkeit des Anwachsens der transplantierten Zellen im Knochenmark und somit einer erfolgreichen Stammzelltransplantation besser eingeschätzt werden<sup>61</sup>.

Der Methylcellulose-Assay wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die mögliche schädigende Wirkung von T-Zellen, die mit einem HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptor gegen CSF2RA ausgestattet wurden, gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen anhand der Anzahl ihrer Koloniebildenden Einheiten (CFU) analysieren zu können.

Der Koloniebildungstest wurde nach dem vorgegebenen Protokoll der Firma STEMCELL Technologies™ durchgeführt<sup>124</sup>. Zuerst wurde das vorher aliquotierte Methylcellulosemedium (3.1.12) bei 4°C über Nacht aufgetaut. Die eingesetzten Effektoren und Targets wurden in IMDM (+10 % FCS) (3.1.12) gewaschen und jeweils 10000 CD34<sup>+</sup> Zellen und 20000 Zellen der übrigen Targets in 1 ml IMDM (+10 % FCS) gegeben. Vor dem Ausplattieren der Zielzellen wurden diese 6 Stunden mit cTCR-transduzierten T-Zellen (anti-CSF2RA oder anti-TRP2, HLA-unabhängig) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % co-inkubiert. Das Effektor:Target-Verhältnis betrug dabei 1:1. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 300 µl der Zellsuspension zu 3 ml Methylcellulosemedium gegeben und mithilfe eines Vortexgerätes vermischt. Dabei entstandene Luftblasen in der Lösung wurden durch 5-minütiges Stehenlassen der Röhrchen bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurden 1,1 ml des Methylcellulosemediums mit Hilfe einer sterilen 3 ml Spritze und einer stumpfen 16 gauge Kanüle in eine 35 mm-Petrischale appliziert. Das semi-solide Medium wurde durch vorsichtiges Rotieren und Neigen der Petrischale gleichmäßig verteilt. Die Targets NOMO-1, K-562\_KO und K-562\_KO/CSF2RA wurden jeweils mit 2000 Zellen/Petrischale eingesetzt, während von den CD34<sup>+</sup> Zellen je 1000/Petrischale ausplattiert wurden. Jeder Testansatz wurde zusammen mit einer weiteren, nicht abgedeckten 35 mm-Petrischale, die 3 ml steriles Wasser enthielt, in einer 100 mm-Petrischale platziert und abgedeckt. Dies sollte ein Austrocknen des Methylcellulosemediums verhindern. Die Schalen wurden anschließend bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur Auszählung der Kolonien inkubiert.

Es war vorher nachgewiesen worden, dass T-Zellen in dem Methylcellulosemedium nicht lebensfähig sind (Daten nicht gezeigt) und somit bei der Auswertung des Koloniebildungstests nach 7 beziehungsweise 14 Tagen die Zahl der von den Targets gebildeten Kolonien nicht durch proliferierende T-Zellen verfälscht wurde. Von allen Zielzellen wurden zur Proliferations- und Differenzierungskontrolle zusätzlich Proben ohne vorherige Co-Inkubation mit den Effektorzellen ausgesät. Die in dem eingesetzten Methylcellulosemedium enthaltenen Komponenten erlaubten eine Differenzierung der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen zu CFU-E (Colony-Forming Unit Erythroid), BFU-E (Burst-Forming Unit Erythroid), CFU-GM (Colony-Forming Unit Granulocyte, Macrophage) und CFU-GEMM (Colony-Forming Unit Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte)<sup>62</sup>. Die Zählung der gebildeten Kolonien erfolgte im Falle der CD34<sup>+</sup> Zellen nach 14 Tagen mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines von STEMCELL Technologies™ zur Verfügung gestellten Rasters, welches unter die 35 mm Zellkulturschalen gelegt wurde. Gleichermaßen wurde auch bei den übrigen Targets vorgegangen, jedoch wurden diese bereits nach sieben Tagen ausgezählt. Als Grund hierfür ist die höhere Proliferationsrate, die zu einem späteren Zeitpunkt eine Abgrenzbarkeit der einzelnen Zellansammlungen unmöglich machte, zu nennen. Die Zählung der Kolonien erfolgte durch zwei Personen und unabhängig voneinander. Es wurde keine Unterscheidung hinsichtlich der Colony-Forming Unit-Subgruppen getroffen, sondern die Gesamtzahl aller Colony-Forming Units, nachfolgend auch als Kolonie-bildende Einheiten bezeichnet, betrachtet. Auch wenn die Zielzellen anhand ihrer Morphologie eindeutig voneinander unterschieden werden konnten, konnte zum Zeitpunkt der Auswertung des Experiments nicht identifiziert werden, ob die Zielzellen vor der Aussaat mit den transgenen T-Zellen inkubiert worden waren und welchen T-Zell-Rezeptor die Effektorzellen exprimierten. So konnte sichergestellt werden, dass die Auszählung unvoreingenommen durchgeführt wurde. Da in dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass die Gegenwart von GM-CSF die Erkennung von Targets, die den GM-CSF-Rezeptor exprimierten, durch den cTCR-αCSF2RA verhindert<sup>6</sup>, wurden die cTCR-transgenen T-Zellen mit den Targets in GM-CSF-freiem Medium inkubiert. Das Methylcellulosemedium hingegen enthielt GM-CSF.

## 4 Ergebnisse

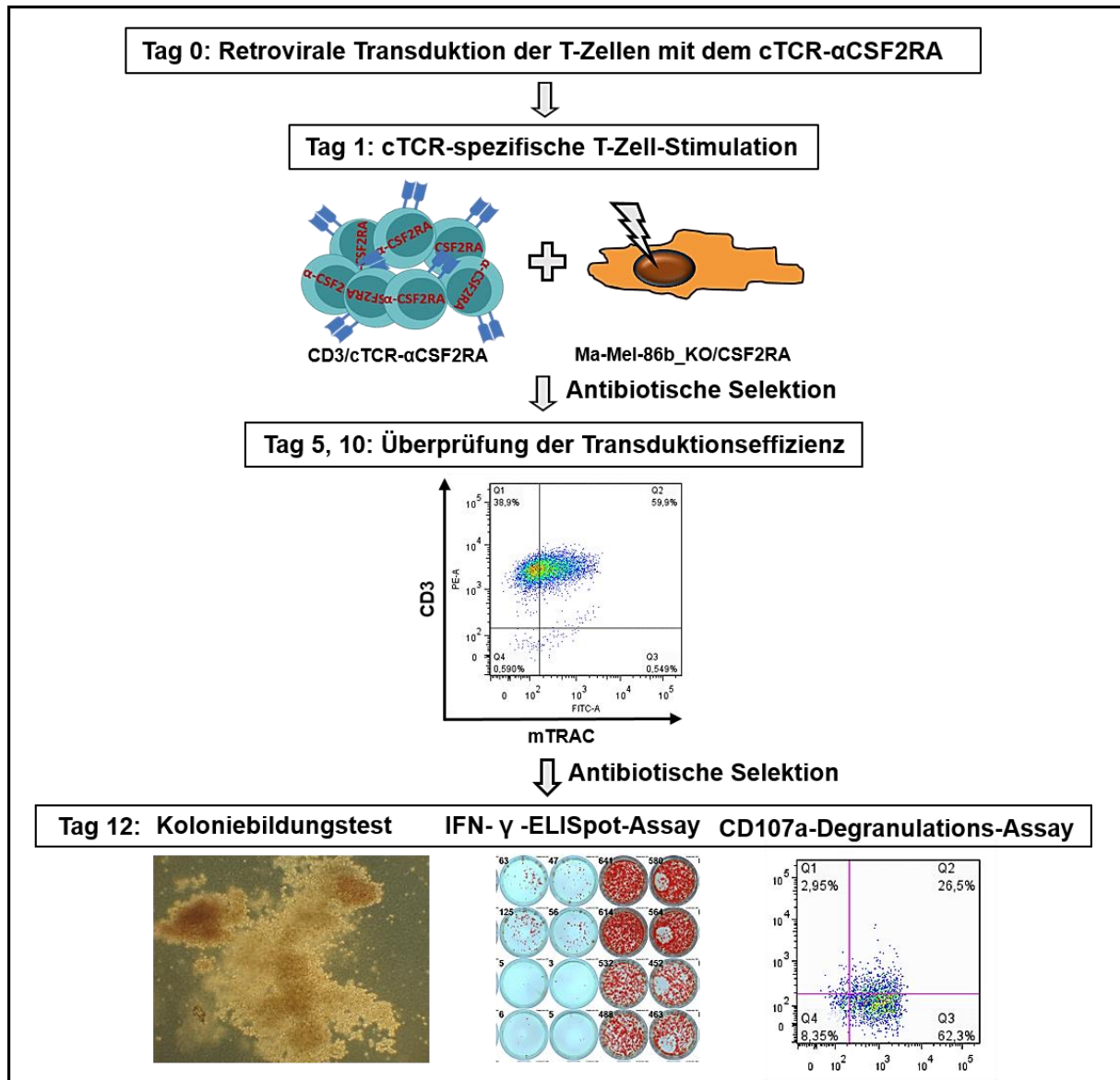
### 4.1 Allgemeines experimentelles Prozedere

CSF2RA wird natürlicherweise von reifen hämatopoetischen Zellen der myeloischen Reihe wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert<sup>50</sup>, aber auch von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen<sup>5</sup>. In vorangegangenen Projekten konnte bereits die spezifische Erkennung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen durch T-Zellen nachgewiesen werden, die mit dem chimärisierten TCR gegen CSF2RA transduziert waren (cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen), wobei in einem einzelnen IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay CD34<sup>+</sup> Zellen nicht erkannt wurden<sup>6</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche zytotoxische Wirkung gegen CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen mit Hilfe sogenannter Koloniebildungsassays weitergehend untersucht werden, um das Potential eines Knochenmarkschadens durch den HLA-unabhängigen TCR gegen CSF2RA besser abschätzen zu können. Dazu wurden CD34<sup>+</sup> Zellen einer sechsständigen Co-Inkubation mit cTCR-T-Zellen unterzogen, bevor sie für 14 Tage in ein semi-solides, speziell für die Proliferation und Differenzierung von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen entwickeltes Methylcellulosemedium überführt wurden. Die Auswertung der gebildeten Kolonien erfolgte manuell durch zwei voneinander unabhängige Untersucher derart, dass während der Zählung der gebildeten Kolonien nicht ersichtlich war, welche Effektor-Target-Kombination sich in der Petrischale befand.

Die Aktivierung der autologen transgenen T-Zellen durch Kontakt zu CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen und die damit möglicherweise einhergehende Sekretion lytischer Granula wurde mit Hilfe eines IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays (**3.2.8**) und eines Degranulations-Assays (**3.2.10**) quantifiziert. Durch die Kombination des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays und des CD107a-Degranulations-Assays wurden die Funktionalität und die Spezifität der transgenen T-Zellen nachgewiesen. Entscheidend für die Analyse der tatsächlichen zytotoxischen Potenz der verwendeten T-Zellen waren jedoch die Koloniebildungstests (**3.2.11**). Die simultane Durchführung der drei verschiedenen Tests mit den jeweils gleichen Effektorzellen erlaubte einen genauen Rückschluss auf die Reaktivität der cTCR-transgenen T-Zellen gegenüber den Targets zum Zeitpunkt der Effektor-Target-Co-Inkubation, die unmittelbar vor Durchführung des Koloniebildungstests angesetzt wurde.

Die in dieser Arbeit nach dem gleichen experimentellen Prozedere untersuchten CD34<sup>+</sup> Zellen sowie die autologen T-Zellen stammten von drei verschiedenen Spendern. Konnte am fünften Tag nach retroviraler Transduktion der autologen T-Zellen mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA oder dem für dieses Projekt irrelevanten, als Kontrolle dienenden cTCR $\alpha$ -TRP2 (**3.2.6.1**) und einmaliger sowie cTCR-spezifischer Stimulation mit bestrahlten Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 durchflusszytometrisch eine cTCR-Expression von mindestens 50 % nachgewiesen werden, wurden die Effektorzellen für weitere sieben Tage kultiviert und zur Anreicherung cTCR-positiver Zellen zusätzlich durch Zugabe von Puromycin selektioniert. Am Tag 12 nach retroviraler Transduktion wurden dann IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, CD107a-Degranulations-Assays und Koloniebildungstests durchgeführt. Für alle drei beschriebenen Tests wurde jeweils stets die gleiche Anzahl cTCR-exprimierender Effektorzellen verwendet, deren cTCR-Expression hierfür jeweils ein bis zwei Tage vor den Experimenten durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Zur Kontrolle der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-vermittelten T-Zell-Erkennung in den IFN- $\gamma$ -ELISpot- und den CD107a-Degranulations-Assays wurden cTCR- $\alpha$ CSF2RA-positive T-Zellen mit der natürlicherweise CSF2RA exprimierenden AML-Zelllinie NOMO-1 und den retroviral mit CSF2RA transduzierten Zelllinien K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA co-inkubiert. Die TRP2-transduzierte Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay als Positivkontrolle für die cTCR- $\alpha$ TRP2-vermittelte Aktivierung anti-TRP2-cTCR-transduzierter T-Zellen verwendet. Als Negativkontrolle der cTCR-vermittelten Aktivität der transgenen T-Zellen dienten CSF2RA- und TRP2-negative Zelllinien wie K562\_KO.

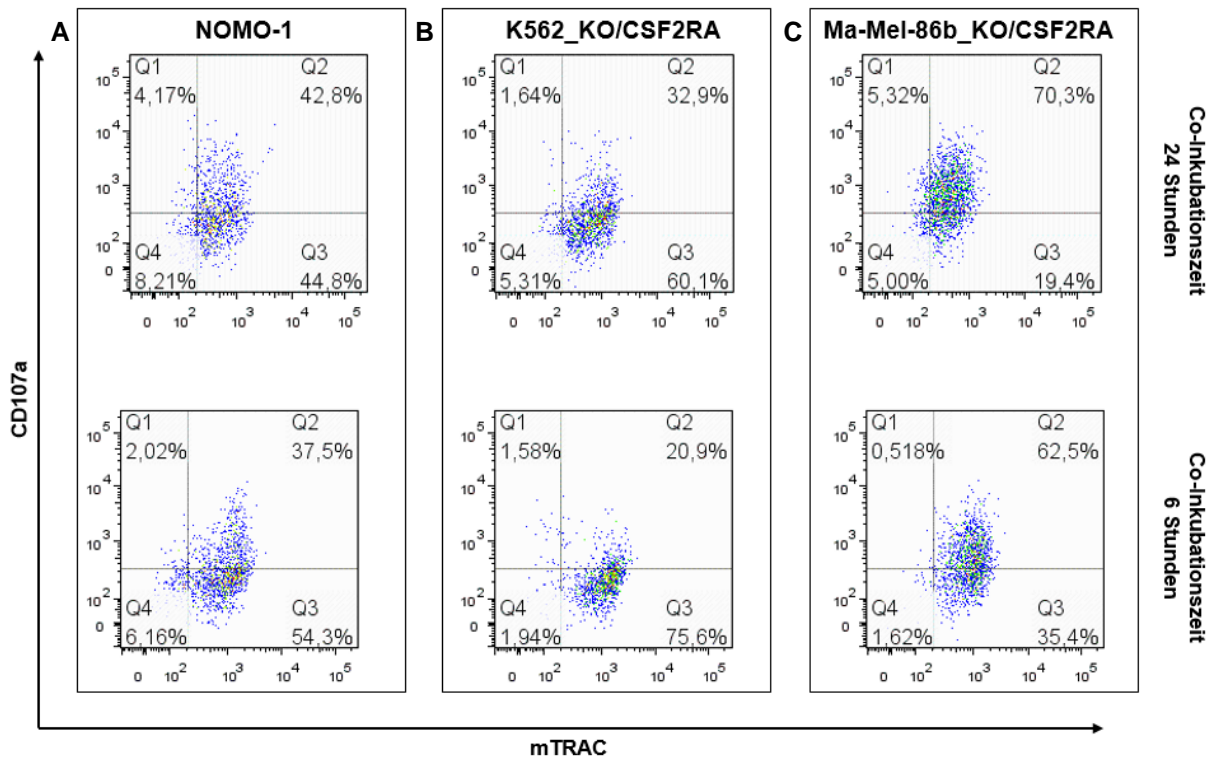
Die CD34<sup>+</sup> Zellen der verschiedenen Spender wurden erst an Tag 12 nach retroviraler Transduktion der T-Zellen aus frisch aufgetauten Aliquots der Leukapheresate isoliert (**3.2.4**) und anschließend unmittelbar als Targets für die autologen, cTCR-transduzierten T-Zellen in den drei verschiedenen Assays eingesetzt. Durch die Verwendung autologer T-Zellen war eine Alloreaktivität der T-Lymphozyten gegenüber den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ausgeschlossen. Die Co-Inkubation der Effektorzellen und der Targets im Rahmen der CD107a-Degranulations-Assays und Koloniebildungstests erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden.



**Abbildung 9: Allgemeines experimentelles Prozedere.**

Die in **Abb. 9** dargestellte experimentelle Vorgehensweise wurde gleichermaßen bei den autologen cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen angewandt.

In einem Pilotexperiment wurde gezeigt, dass die Degranulation der T-Zellen bereits nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden gegenüber einer Testdauer von 24 Stunden ausreichend gut erkannt werden kann (**Abb.10**).



**Abbildung 10: Die CD107a-Expression der cTCR-transgenen Zellen nach sechs- und nach 24-stündiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets im Degranulations-Assay.** Nach sechsstündiger bzw. nach 24-stündiger Co-Inkubation der Effektor- und Targetzellen erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der CD107a- und der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-Expression transgener CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die T-Zellen wurden sechs Tage nach Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA für die Durchführung des CD107a-Degranulations-Assays benutzt. Das Effektor: Target-Verhältnis betrug 1:1 bei je 150.000 eingesetzten Zellen. Die cTCR-Expression wurde mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen mTRAC, die CD107a-Expression mit einem PE-Cy5-gekoppelten Antikörper bestimmt. Das Gating der gezeigten FACS-Daten wurde anhand von zusätzlich angefertigten IgG1-Isotypkontrollen (nicht gezeigt) festgelegt. Alle verwendeten T-Zellen wurden zuvor aus dem Buffy Coat #1425858 isoliert. **A:** CD107a-/cTCR- $\alpha$ CSF2RA -Expression von transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Co-Inkubation mit NOMO-1. Nach 6 Stunden (unten) exprimierten 37,5 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD107a und den transgenen TCR an ihrer Oberfläche (Q2). Nach einer Co-Inkubation von 24 Stunden (oben) konnte der exogene TCR zusammen mit CD107a auf 42,8 % der untersuchten CD4<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Q2). **B:** CD107a-/mTRAC-Färbung von transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Co-Inkubation mit K562\_KO/CSF2RA. Nach 6 Stunden (unten) exprimierten 20,9 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD107a und den exogenen TCR (mTRAC-Färbung) (Q2), nach 24 Stunden (oben) 32,9 % (Q2) aller gemessenen Effektorzellen. **C:** CD107a-/mTRAC-Färbung von CD4<sup>+</sup> transgenen T-Zellen nach Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA. Nach 6 Stunden (unten) exprimierten 62,5 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD107a und den anti-CSF2RA-cTCR (mTRAC-Färbung) (Q2), nach 24 Stunden (oben) 70,3 % (Q2). Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

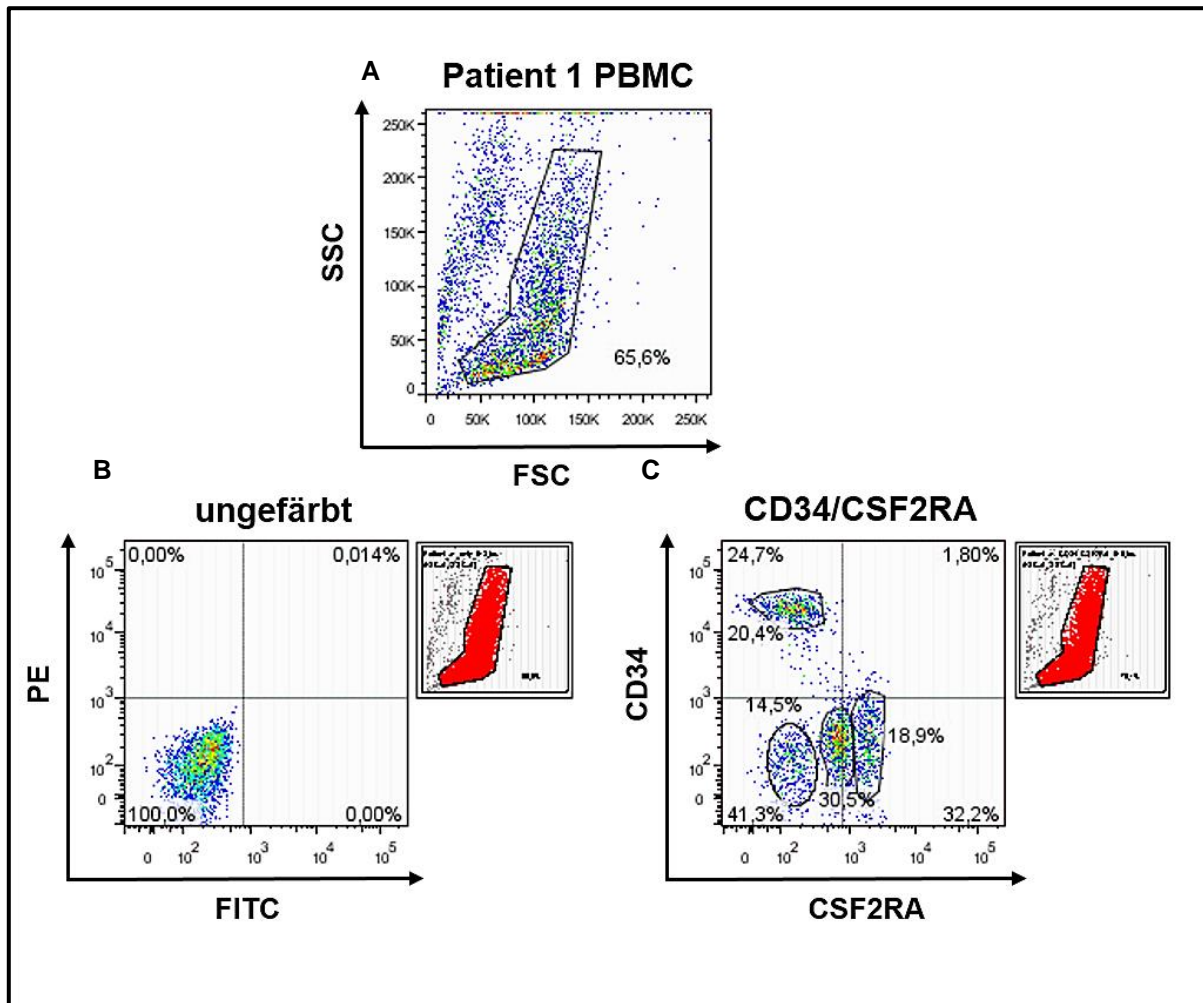
## 4.2 Spender 1

Die erste untersuchte Probe stammte aus dem Leukapheresat eines Patienten, der an einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom erkrankt und autolog transplantiert worden war. Die Leukapherese erfolgte nach der Vorbehandlung des Patienten mit G-CSF zur Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut.

### 4.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der CSF2RA- und CD34-Expression verschiedener hämatopoetischer Zellen des Spenders 1

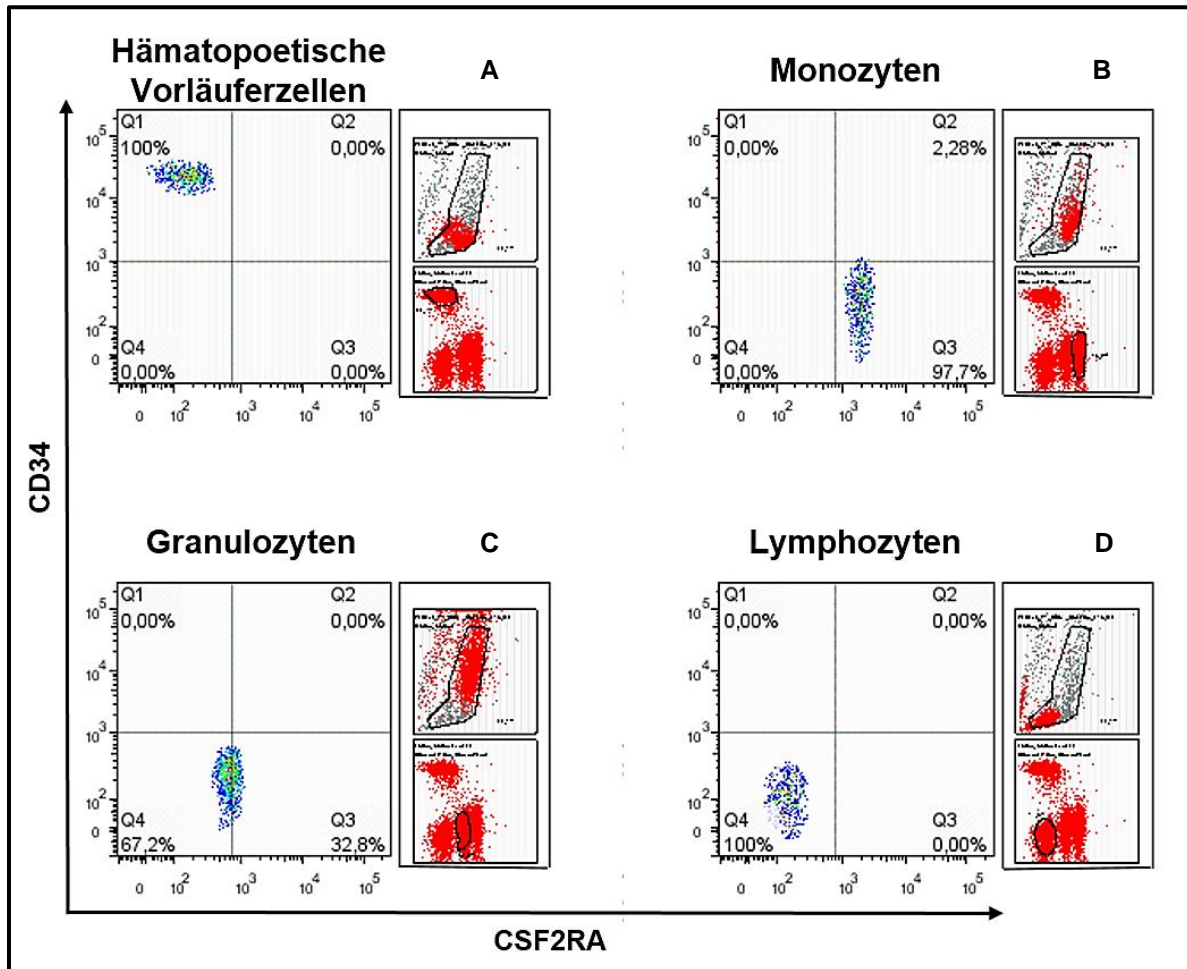
Im ersten Schritt wurde die Oberflächenexpression der Leukapheresat-Zellen untersucht. Die frisch aufgetauten Proben (**3.1.11.5**) wurden hierzu mit einem anti-CD34 Antikörper und einem anti-CSF2RA Antikörper (**3.1.7**) angefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen aus den Leukapheresaten wurden keine hämatopoetischen Zellen identifiziert, die simultan CD34 und CSF2RA auf ihrer Oberfläche exprimierten (**Abb.11 C**). 20,4 % der in der Probe gemessenen vitalen Zellen exprimierten CD34, aber kein CSF2RA. Weiterhin wurde eine CD34-negative, aber schwach CSF2RA-positive Zellpopulation detektiert, der 30,5 % der vitalen Zellen angehörten. Eine CD34-negative, aber stärker CSF2RA-exprimierende Zellpopulation (18,9 % der vitalen Zellen) wurde ebenfalls identifiziert. Zusätzlich wurde eine CD34<sup>-</sup>/CSF2RA<sup>-</sup> Zellpopulation nachgewiesen, die 14,5 % aller vitalen Leukapheresat-Zellen beinhaltete. Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Zellpopulationen, die durch ihr CD34/CSF2RA-Expressionsmuster voneinander abgegrenzt wurden, bestimmten hämatopoetischen Zellen zugeordnet (**Abb. 12**). Hierfür wurden alle vitalen Zellen des Spenders 1 anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreuung, FSC), ihrer Granularität (Seitliche Streuung, SSC) und anhand ihres CD34- und CSF2RA-Expressionsniveaus unterschieden.





**Abbildung 11: Die CD34/CSF2RA-Oberflächenexpression der Leukapheresat-Zellen des Spenders 1.** Mithilfe einer durchflusszytometrischen Bestimmung der CD34- und CSF2RA-Expression auf der Zelloberfläche der Zellen aus dem peripheren Blut konnten unterschiedliche, in der Probe enthaltene Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden. Die CD34-Expression wurde durch einen monoklonalen PE-gekoppelten anti-CD34 Antikörper analysiert. Die CSF2RA-Expression wurde durch Färbung mit einem monoklonalen FITC-markierten anti-CSF2RA-Antikörper ermittelt. Das Backgating ist jeweils in Rot dargestellt und zeigt die den jeweiligen Plots zugrundeliegenden Zellpopulationen in SSC und FSC. **A:** In FSC und SSC wurden 65,5 % der in der Probe enthaltenen Zellen als vital identifiziert. **B:** FACS-Analyse ungefärbter Leukapheresat-Zellen des Spenders 1. Anhand des ungefärbten Ansatzes wurden die Gates für die anschließende Analyse der anti-CSF2RA- und anti-CD34-gefärbten Zellen festgelegt. **C:** Durchflusszytometrische Analyse der CD34- und CSF2RA-Expression der Leukapheresat-Zellen des Spenders 1. Es konnten CD34-positive, CSF2RA-negative Zellen (20,4 %) sowie CD34- und CSF2RA-negative Zellen (14,5 %) identifiziert werden. Zusätzlich wurden zwei CD34-negative Zellpopulationen gefunden, von denen eine deutlich CSF2RA exprimierte (18,9 %), während bei der anderen, die 30,5 % aller gemessenen Zellen enthielt, nur etwa 13 % der Zellen CSF2RA auf ihrer Oberfläche exprimierten. Abkürzungen.: FSC: engl. forward scatter (Vorwärtsstreuung), SSC: engl. side scatter (Seitliche Streuung)

Mithilfe einer Panelfärbung für die Oberflächenmoleküle CD11b, CD33, CD34, CD45, CD87, CD116 (CSF2RA), CD117 wurden in der Probe des Spenders 1 CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten identifiziert, die sich auch anhand ihrer CD34/CSF2RA-Oberflächenexpression voneinander abgrenzen ließen (**Abb. 12**).



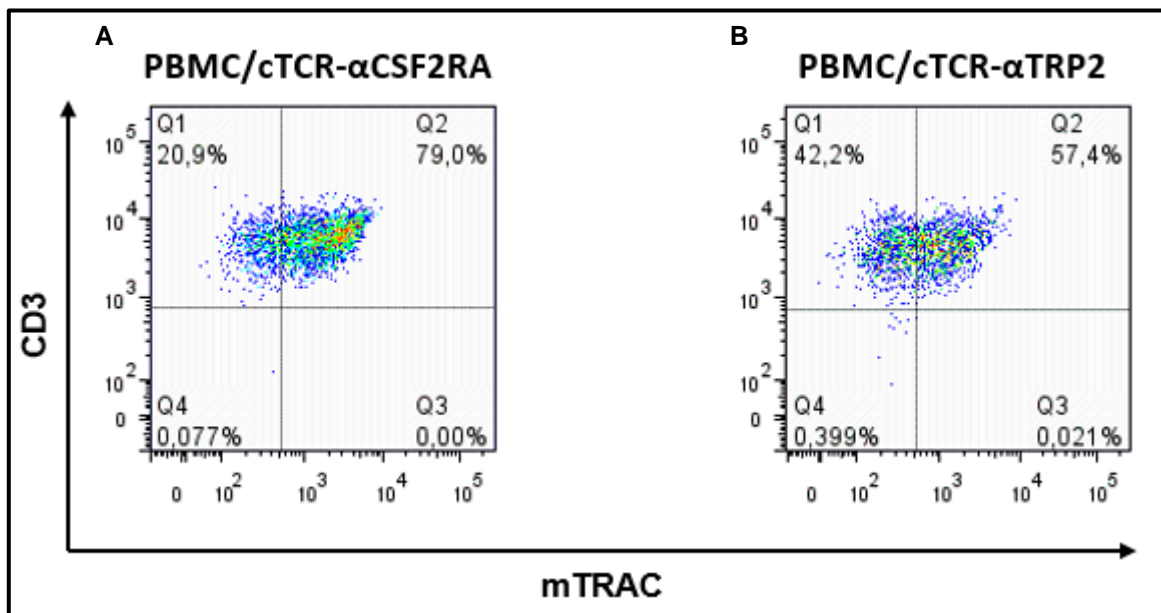
**Abbildung 12: Durchflusszytometrische Identifizierung der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1.** Die Leukapheresat-Zellen konnten anhand ihrer Größe, ihrer Granularität und ihrer CD34-/CSF2RA-Expression verschiedenen Populationen zugeordnet werden. Das Backgating wurde in Rot dargestellt und zeigt die den jeweiligen Plots zugrundeliegenden Zellpopulationen in SSC und FSC sowie in der CD34-PE und CSF2RA-FITC markierten Probe. **A:** CD34-/CSF2RA-Expression hämatopoetischer Vorläuferzellen. 100% der hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimierten CD34, jedoch kein CSF2RA (0%). **B:** CD34-/CSF2RA-Expression reifer Monozyten. 97,7 % aller enthaltenen Monozyten exprimierten CSF2RA auf ihrer Oberfläche. Die CD34-Expression der in der Probe enthaltenen Monozyten lag bei 2,28 %. **C:** CD34-/CSF2RA-Expression reifer Granulozyten. 32,8 % der Granulozyten zeigten eine eindeutige CSF2RA-Oberflächenexpression. Es wurde keine CD34-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche nachgewiesen (0%). **D:** CD34-/CSF2RA-Expression reifer Lymphozyten. Es wurde keine CD34- bzw. CSF2RA-Oberflächenexpression auf Lymphozyten des Spenders 1 detektiert (0%). Abkürzungen: FSC: engl. forward scatter (Vorwärtsstreuung), SSC: engl. side scatter (Seitliche Streuung)

In der durchflusszytometrischen Analyse der so identifizierten CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 1 konnte keine Oberflächenexpression der alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors (CSF2RA) nachgewiesen werden (**Abb. 12 A**). Im Gegensatz dazu exprimierten nahezu alle der in der Probe enthaltenen Monozyten CSF2RA, jedoch kein CD34 auf ihrer Oberfläche (**Abb. 12 B**). Mehr als ein Drittel der abgegrenzten Granulozyten exprimierten deutlich CSF2RA. Die klar abgegrenzte Population wies jedoch darauf hin, dass wahrscheinlich alle gemessenen Granulozyten CSF2RA zumindest schwach exprimierten. Die CD34-Expression war im Falle aller untersuchten Granulozyten negativ (**Abb. 12 C**). Für die Zellpopulation der Lymphozyten

konnte weder eine CSF2RA- noch eine CD34-Oberflächenexpression nachgewiesen werden (**Abb. 12 D**).

#### 4.2.2 Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

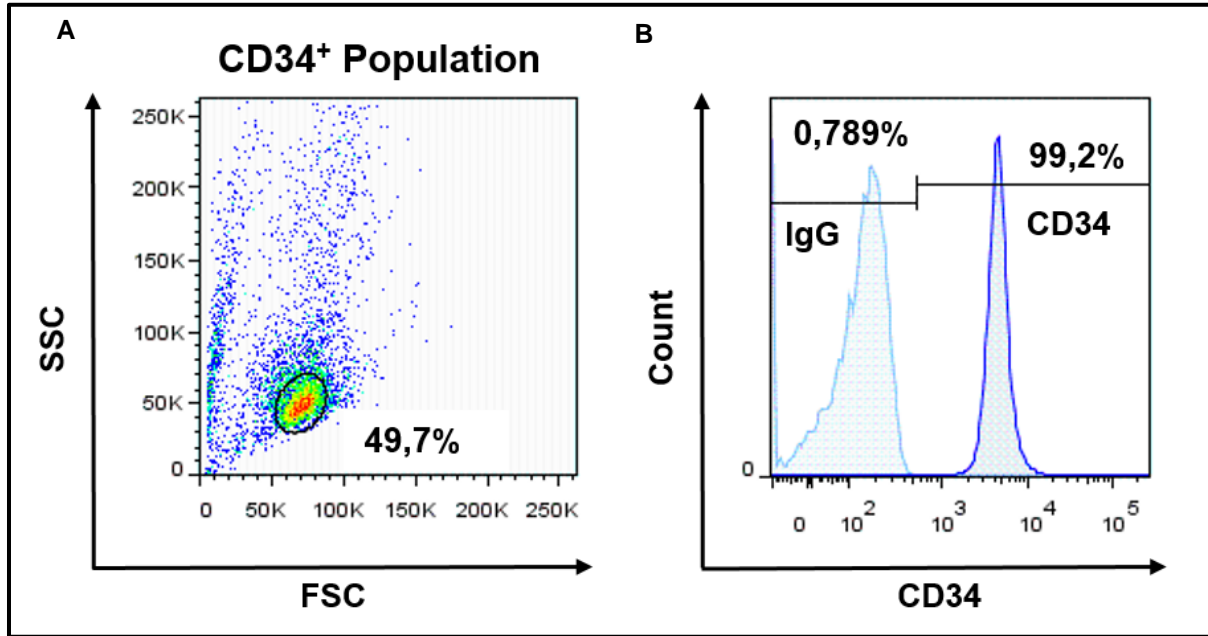
Nach dem Auftauen der Leukapheresat-Probe wurden die enthaltenen Zellen ohne vorherige Isolation der T-Zellen retroviral mit den HLA-unabhängigen cTCRs gegen CSF2RA (cTCR- $\alpha$ CSF2RA) oder gegen TRP2 (cTCR- $\alpha$ TRP2) transduziert (**3.2.6.1**). Durch die Kultivierung der transgenen T-Zellen in Medium, das durch IL-2-Zugabe speziell für die Expansion der T-Lymphozyten genutzt wurde, konnten in Kombination mit antibiotischer Selektion über eine Dauer von mehreren Tagen erfolgreich transduzierte T-Zellen in der Kultur angereichert werden. Für die nachfolgenden Experimente wurden stets CD3<sup>+</sup> T-Zellen verwendet und somit nicht zwischen den Effekten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschieden. Fünf Tage nach der Antigen-getriebenen Stimulation der transgenen T-Zellen mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde der Anteil cTCR-transduzierter T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die cTCR-transgenen Zellen eine weitere Woche kultiviert und zur Anreicherung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-positiven Zellen mit Puromycin (1  $\mu$ g/ml) weiter selektioniert. Zwölf Tage nach der einmaligen T-Zell-Stimulation mit den Melanomzelllinien wurde die Oberflächenexpression des exogenen TCRs mithilfe eines Antikörpers gegen die murine konstante Region der  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (mTRAC) gemessen. 79 % der mit cTCR- $\alpha$ CSF2RA transduzierten T-Zellen exprimierten den exogenen TCR (**Abb. 13 A**). Im Gegensatz dazu exprimierten lediglich 57,4 % der cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen den gegen humanes TRP2 gerichteten Kontroll-TCR (**Abb. 13 B**). Beide cTCR-transgenen Populationen waren aufgrund ihrer gemessenen CD3-Oberflächenexpression von über 99 % als reine T-Zell-Populationen anzusehen (**Abb. 13 A, B**).



**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-Oberflächenexpression der Leukapheresat-Zellen des Spenders 1.** An Tag 12 nach retroviraler Transduktion der Leukapheresat-Zellen wurde die Expression beider cTCRs mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Selektion erfolgte mit Puromycin (1 mg/ml). Der zur cTCR-Expressions-Bestimmung verwendete Antikörper gegen mTRAC war mit FITC, der anti-CD3- Antikörper mit PE gekoppelt. Das Gating der gezeigten Daten wurde anhand von zusätzlich angefertigten IgG1-Isotypkontrollen (nicht gezeigt) festgelegt. **A:** 79 % der mit dem cTCR gegen CSF2RA transduzierten Leukapheresat-Zellen waren mTRAC<sup>+</sup> und exprimierten somit den exogenen TCR auf ihrer Zelloberfläche. **B:** 57,4 % der mit dem cTCR gegen TRP2 transduzierten Leukapheresat-Zellen waren mTRAC<sup>+</sup> und exprimierten somit den exogenen Kontroll-TCR auf ihrer Zelloberfläche. **A, B:** >99 % der analysierten Zellen exprimierten den Oberflächenmarker CD3, was auf eine reine T-Zell-Population schließen ließ. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

4.2.3 Isolation der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1

Die Isolation der CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte unmittelbar vor der simultanen Durchführung des IFN- $\gamma$ -ELISpots, des CD107a-Degranulations-Assays und des Koloniebildungstests. Die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation durch anti-CD34 MicroBeads aufgereinigt (3.2.5). Die CD34-Expression der so isolierten Zellpopulation wurde anschließend durchflusszytometrisch überprüft und für nahezu alle der isolierten vitalen Zellen bestätigt (Abb. 14 B).

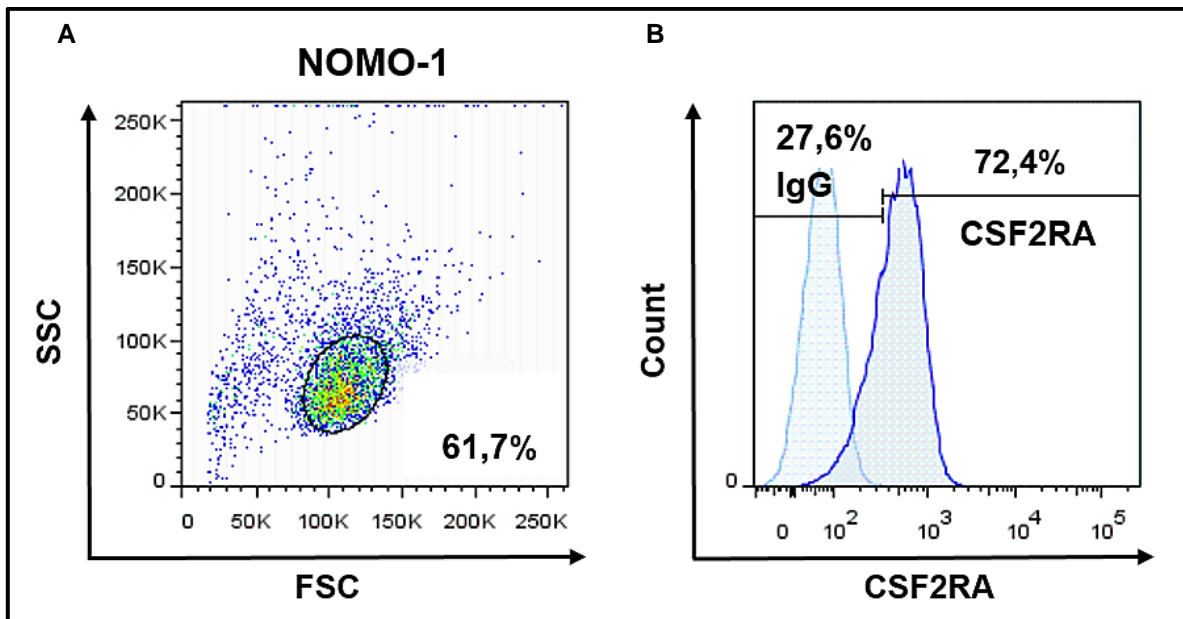


**Abbildung 14: Aufreinigung CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1.** Zum Nachweis der erfolgreichen Isolation CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 1 wurde die CD34-Expression der mit Hilfe magnetischer Beads isolierten Zellpopulation mittels PE-gekoppelter anti-CD34-Antikörper bestimmt. **A:** 49,7 % der CD34-isolierten Zellen in der Probe wurden als vital identifiziert und auf ihre CD34-Expression untersucht. **B:** 99,2% der isolierten Zellen exprimierten den Oberflächenmarker CD34 (dunkelblauer Graph). Die CD34-Expression wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen. Das Gating der gezeigten Durchflusszytometrie-Daten wurde anhand einer zusätzlich angefertigten IgG1-Isotyp-Kontrolle (hellblauer Graph) festgelegt. Abkürzungen: FSC: engl. forward scatter (Vorwärtsstreuung), SSC: engl. side scatter (Seitliche Streuung)

#### 4.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der CSF2RA-Expression auf den Targets NOMO-1, K562\_KO und K562\_KO/CSF2RA

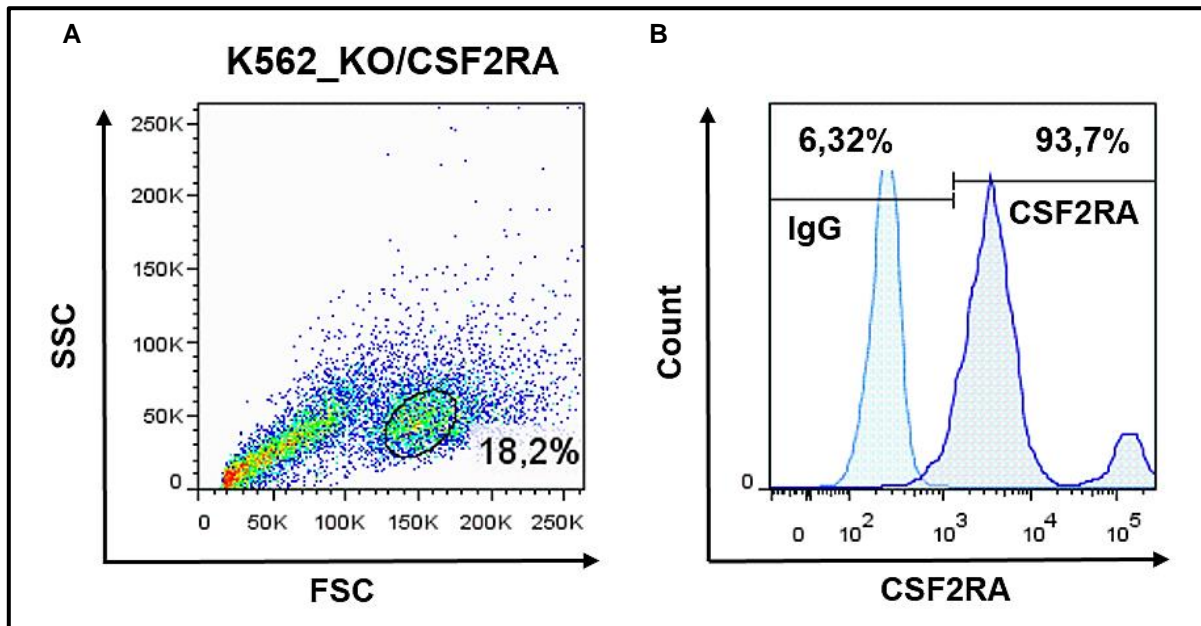
Bevor die verschiedenen Zelllinien als Targets für die cTCR-transgenen T-Zellen im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, im CD107a-Degranulations-Assay und im Koloniebildungstest eingesetzt wurden, wurde die CSF2RA-Expression durchflusszytometrisch mit einem PE-gekoppelten anti-CSF2RA Antikörper bestimmt.

Die Zellen der AML-Zelllinie NOMO-1 zeigten zu 72,4 % eine endogene CSF2RA-Expression (**Abb.15**).



**Abbildung 15: CSF2RA-Expression der AML-Zelllinie NOMO-1.** A: 61,7 % der in der Probe enthaltenen NOMO-1-Zellen wurden als vital identifiziert und weiter auf ihre CSF2RA-Expression untersucht. B: Mindestens 72,4 % der vitalen NOMO-1-Zellen exprimierten CSF2RA auf ihrer Zelloberfläche (dunkelblauer Graph). Die CSF2RA-Expression wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen. Das Gating der gezeigten FACS-Daten wurde anhand einer zusätzlich angefertigten IgG1-Isotyp-Kontrolle (hellblauer Graph) festgelegt. Abkürzungen: FSC: engl. forward scatter (Vorwärtsstreuung), SSC: engl. side scatter (Seitliche Streuung)

Die Zelllinie K562\_KO wurde aufgrund der fehlenden CSF2RA-Expression (Daten nicht gezeigt) retroviral mit humanem CSF2RA transduziert und anschließend zur Selektion mit G418 kultiviert (**3.2.6.2**). Die Transduktionseffizienz wurde 4 Tage nach antibiotischer Selektion durchflusszytometrisch mit Hilfe eines PE-gekoppeltem Antikörpers gegen CSF2RA bestimmt. Die Expression des humanen CSF2RA war bei mehr als 90 % der transduzierten K562\_KO/CSF2RA-Zellen auf der Oberfläche nachweisbar (**Abb. 16**). Die transgenen Zellen dieser Bulkpopulation der K562\_KO/CSF2RA wurden für alle folgenden Tests der Spender 1, 2, und 3 verwendet. Es wurden also im Folgenden keine neuen Transfektanten hergestellt.



**Abbildung 16: CSF2RA-Expression der stabil mit CSF2RA transduzierten Zelllinie K562\_KO.** K562\_KO wurden retroviral mit humanem CSF2RA transduziert. **A** 18,2 % der in der Probe enthaltenen K562\_KO/CSF2RA wurden als vital identifiziert. **B:** Die CSF2RA-Expression wurde 4 Tage nach Transduktion und anschließender G418-Selektion bei 93,7 % der analysierten Zellen nachgewiesen (dunkelblauer Graph). Das Gating der gezeigten Durchflusszytometrie-Daten wurde anhand einer zusätzlich angefertigten IgG1-Isotyp-Kontrolle (hellblauer Graph) festgelegt. Abkürzungen: FSC: engl. forward scatter (Vorwärtsstreuung), SSC: engl. side scatter (Seitliche Streuung)

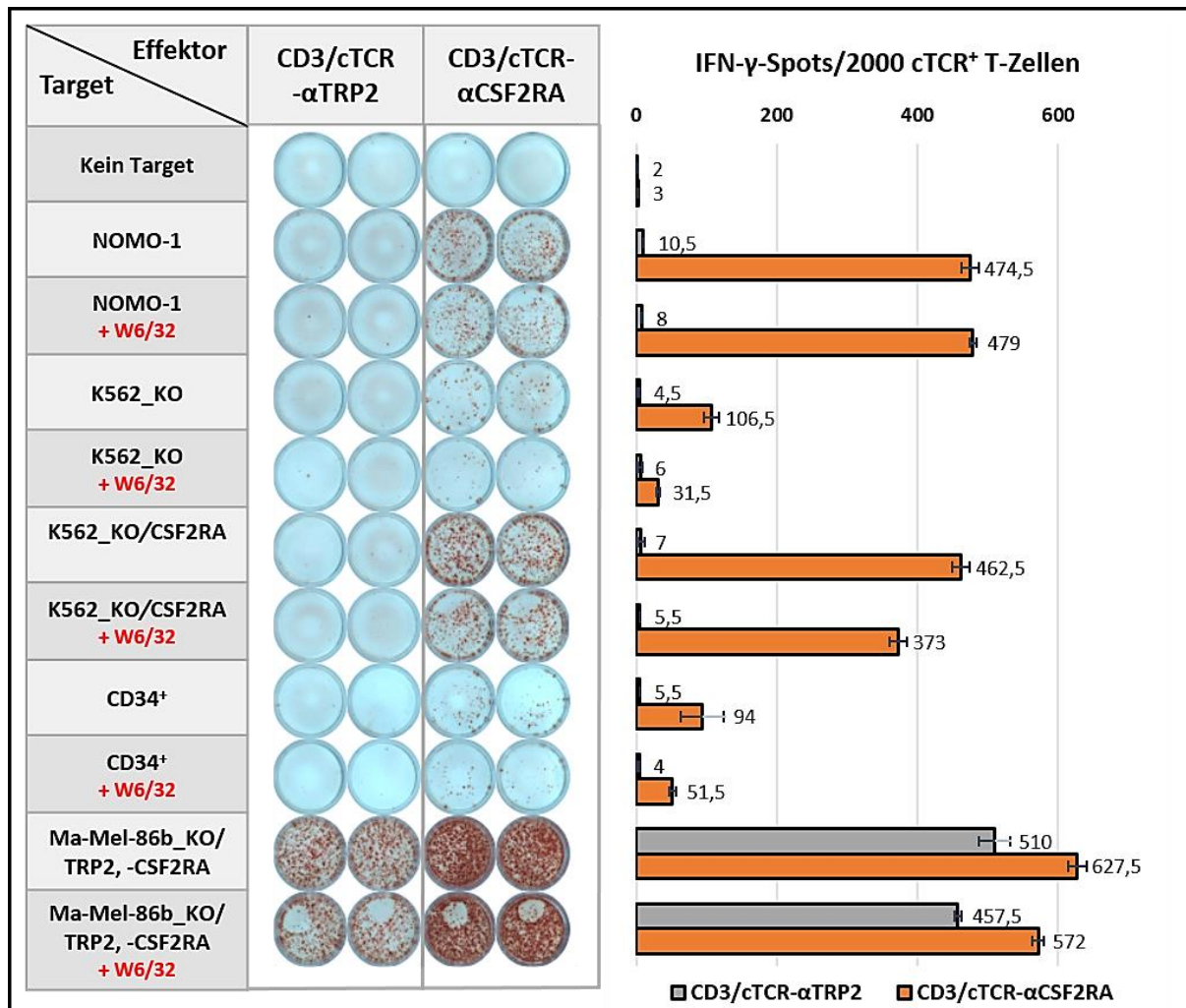
Die Expression der cTCR-Zielantigene CSF2RA und TRP2 auf den Melanomzellen (Ma-Mel-86b) wurde über die HLA-Klasse I-unabhängige T-Zell-Erkennung in den IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays nachgewiesen (4.2.5, 4.3.3, 4.4.3). Innerhalb des Zeitraumes dieser Arbeit stand für die durchflusszytometrische Analyse kein Antikörper gegen das humane Antigen TRP2 zur Verfügung.

#### 4.2.5 Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen durch cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen des Spenders 1

Zur Überprüfung ihrer Spezifitäten wurden die cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und die cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen (CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2) (4.2.2) 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b-KO/TRP2 in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen und weiteren Targets getestet (Abb. 17). Zum Nachweis der HLA-Klasse I-unabhängigen Erkennung der Targets durch die cTCR-transduzierten T-Zellen wurde die spezifische Erkennung der transgenen T-Zellen zusätzlich mit dem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 (3.2.9) blockiert.

Weder die den cTCR- $\alpha$ CSF2RA- noch die cTCR- $\alpha$ TRP2-positiven T-Zellen (CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2) zeigten eine spontane Interferon- $\gamma$ -Sekretion ohne Stimulation durch Targets. Mit der AML-Zelllinie NOMO-1 wurde eine natürlicherweise CSF2RA-exprimierende Targetzelllinie ausgewählt (3.1.11.1). NOMO-1 wurden deutlich von den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA erkannt. Diese Erkennung konnte durch den anti-HLA-Klasse I-Antikörper W6/32 nicht blockiert werden. Eine vergleichbare Spot-Bildung der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA konnte durch die Co-Inkubation mit K562\_KO/CSF2RA (3.1.11.2) beobachtet werden. Die stärkste Aktivierung der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurde jedoch nach Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA (3.1.11.3) detektiert. Die IFN-gamma-Sekretion konnte im Falle beider CSF2RA-transduzierter Zelllinien durch die Zugabe von W6/32 nicht oder nur unwesentlich vermindert werden. Die Co-Inkubation der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten Effektorzellen mit der Zelllinie K562\_KO resultierte lediglich in einer geringfügigen Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung der Effektoren, welche durch die Zugabe des HLA-Klasse I-Antikörpers

deutlich vermindert wurde. Dies weist auf eine Alloreaktivität der T-Zellen gegenüber der Leukämiezelllinie hin. Schließlich wurden die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA durch Zugabe der autologen CD34<sup>+</sup> Zellen nur wenig aktiviert, wobei die Erkennung der CD34<sup>+</sup> Zellen nur zum Teil durch die Zugabe von W6/32 blockiert wurde.



**Abbildung 17: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen des Spenders 1.** Zwölf Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die Erkennung der CD34<sup>+</sup> Zellen sowie weiterer Targets untersucht. Zur Analyse der HLA-Klasse I-unabhängigen Erkennung der Targets durch die transgenen T-Zellen wurde jede Effektor-Target-Kombination zusätzlich mit W6/32, einem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper, getestet. Es wurden pro Well 2000 cTCR<sup>+</sup> T-Zellen (Effektoren) und 50000 Zellen der Targets eingesetzt. Die cTCR-Expression lag bei den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, gemessen am Tag zuvor, bei 79 %, im Falle der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 bei 57,4 %. **Links:** Original-Ergebnis des durchgeführten ELISpot-Assays. Die Targetzellen der verschiedenen Ansätze sind linksseitig aufgeführt, W6/32-Zugabe ist in roter Schrift angegeben. Die Effektoren sind oben genannt. Gezeigt sind jeweils Doppelwerte für jeden Ansatz. Die Auszählung dieser Spots liegt dem rechtsseitigen Balkendiagramm zugrunde. **Rechts:** Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der IFN-gamma-Spots/Well von Doppelwerten dar. Ansätze mit CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 als Effektoren sind in Grau dargestellt, Ansätze mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA in Orange.

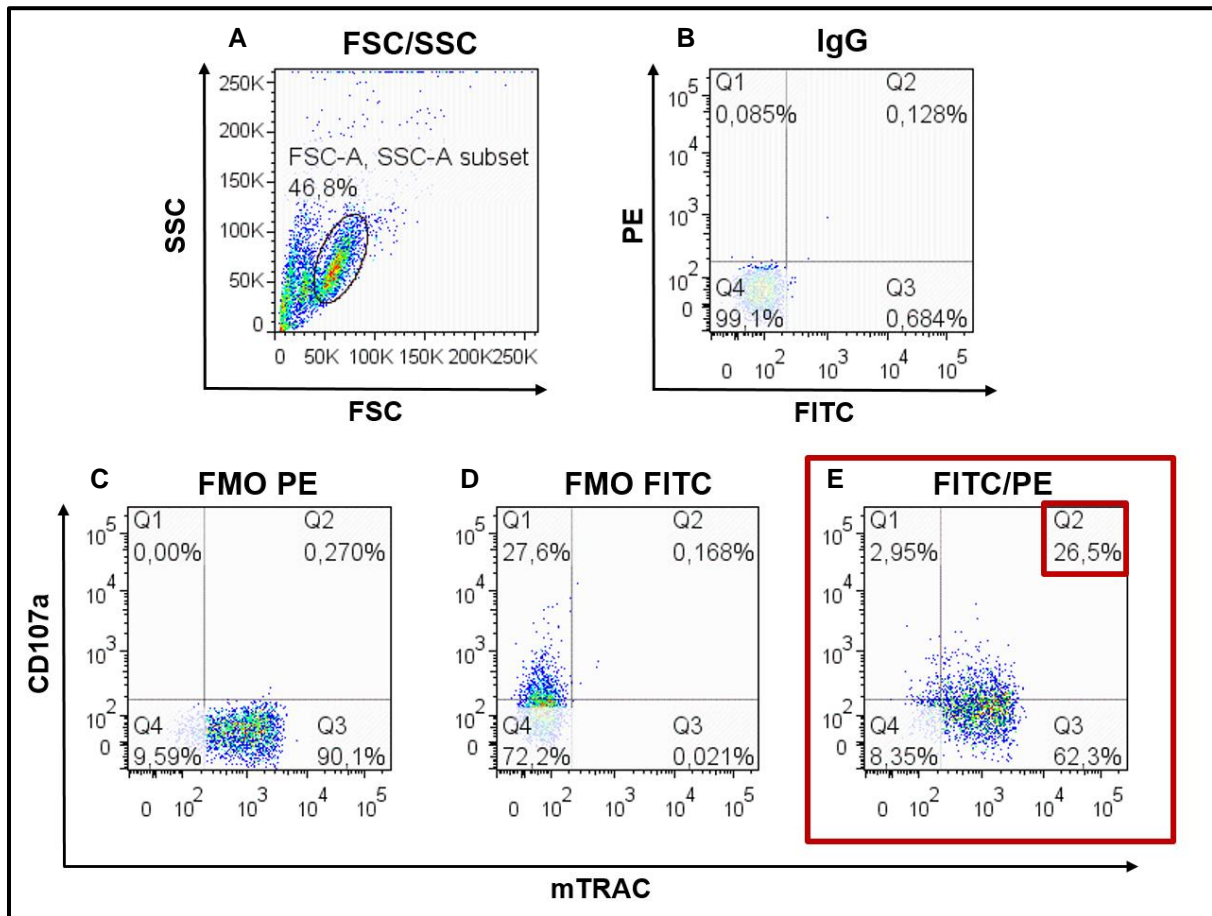
Die CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 erkannten erwartungsgemäß nur die TRP2-positive und HLA I/II-negative Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Die beobachtete T-Zell-Aktivierung war durch die Zugabe von W6/32 nicht blockierbar.

#### 4.2.6 CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 1 durch Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Mithilfe des CD107a-Degranulations-Assays wurde die zytotoxische Aktivität der cTCR-transgenen T-Zellen indirekt über die Sekretion lytischer Granula beurteilt. Dabei wurde das lysosomale Membranmolekül CD107a im Falle der einsetzenden T-Zell-Degranulation durch die Verschmelzung der lytischen Granula mit der T-Zell-Membran auf der Zelloberfläche der untersuchten T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Die in den **Abb. 19, 26** und **30** dargestellten Ergebnisse aller CD107a-Degranulations-Assays der drei untersuchten Spender entsprechen den jeweiligen Anteilen der getesteten T-Zellen, die simultan CD107a- und den cTCR- $\alpha$ CSF2RA oder den cTCR- $\alpha$ TRP2 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Da die diesen Ergebnissen zugrundeliegenden Durchflusszytometrie-Daten dort nicht gezeigt werden (**8.3**), wird die verwendete Gating-Strategie für die Auswertung der CD107a-Degranulations-Assays aller drei Spender beispielhaft an einem Testansatz, der durch PMA/Ionomycin-stimulierte CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 1 enthält, in **Abb. 18** dargestellt. Das anhand des Spenders 1 erläuterte Gating (**Abb. 18**) repräsentiert ein wichtiges Zwischenergebnis für die Analyse aller T-Zellen der drei verschiedenen Spender und wird deshalb im Folgenden genauer beschrieben. Zunächst wurden die vitalen Zellen über eine Darstellung im FSC/SSC bestimmt (**Abb. 18 A**), die dann zur weiteren Analyse herangezogen wurden. Für die Identifizierung von T-Zellen, die sowohl CD107a als auch den exogenen cTCR- $\alpha$ CSF2RA auf ihrer Zelloberfläche exprimierten (CD107a<sup>+</sup>/cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup>), wurden für die jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper sowohl Isotyp-Kontrollen (**Abb. 18 B**) als auch FMO (engl. *Fluorescence Minus One*)-Kontrollen (**Abb. 18 C, D**) mitgeführt. Beide Kontrollen wurden anschließend für die Festlegung der in **Abb. 18** gezeigten Gates verwendet, sodass diejenigen Zellen mit simultaner CD107a- und cTCR- $\alpha$ CSF2RA-Expression anschließend möglichst genau definiert werden konnten. Im Falle der untersuchten T-Zellen des Spenders 1 konnte dies für etwa ein Viertel der analysierten T-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 18 E Q2**).



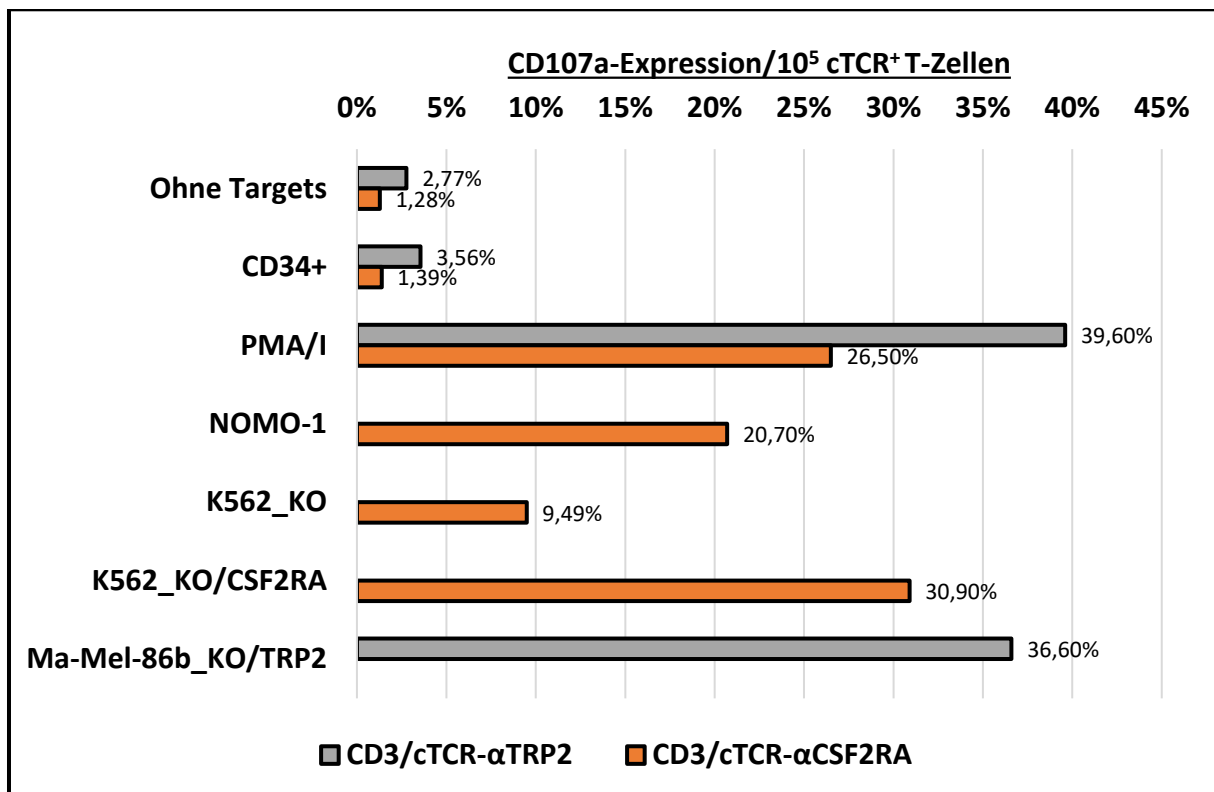


**Abbildung 18: Erläuterung der Gating-Strategie zur Auswertung aller CD107a-Degranulations-Assays anhand der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 1.** FACS-Analyse der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 1 nach sechsständiger Inkubation mit PMA/Ionomycin. Gates zur Identifizierung degranulierender, transgener T-Zellen (CD107a<sup>+</sup>/cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup>) wurden mithilfe von Isotyp- und FMO-Kontrollen festgelegt. T-Zellen, die den cTCR- $\alpha$ TRP2 exprimierten, wurden mit der gleichen Gatingstrategie analysiert. **A:** 46,8 % der in der Probe enthaltenen T-Zellen wurden in FSC/SSC als vital identifiziert und wurden für die CD107a- und cTCR-Expressions-Bestimmungen herangezogen. **B:** Färbung der cTCR-transgenen T-Zellen mit IgG1-FITC/PE Antikörpern als Isotyp-Kontrolle für die Analyse unspezifischer Bindungen der verwendeten Antikörper an die zu untersuchenden Zellpopulationen. **C:** Die FMO-PE-Kontrolle diente der Überprüfung, ob der FITC-gekoppelte Antikörper gegen mTRAC zum Nachweis der cTCR-Expression in den Kanal des PE-gekoppelten Antikörpers gegen das lysosomale Membranmolekül CD107a strahlte. **D:** Die FMO-FITC-Kontrolle diente der Überprüfung, ob der PE-gekoppelte Antikörper gegen das lysosomale Membranmolekül CD107a in den Kanal des FITC-gekoppelten Antikörpers mTRAC zum Nachweis der cTCR-Expression strahlte. **E:** Analyse der Oberflächenexpression von CD107a und des cTCR auf T-Zellen des Spenders 1. **E, Q2:** Nach Ionomycin- und PMA-Stimulation wurde auf 26,5 % der analysierten T-Zellen eine simultane Expression von CD107a und dem exogenen cTCR gegen CSF2RA detektiert. Abkürzungen: FSC: engl. forward scatter, Vorwärtsstreuung; SSC: engl. side scatter, seitliche Streuung; mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

Die Ergebnisse des CD107a-Degranulations-Assays des Spenders 1 sind in **Abb. 19** dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Um die cTCR-spezifische Degranulation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 exakter bestimmen zu können, wurden zusätzlich deren spontane Degranulationsfähigkeiten, ohne vorherige Stimulation durch Targets, analysiert. Die transgenen T-Zellen zeigten 12 Tage nach Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA beziehungsweise Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 ohne Co-Inkubation mit einem Target keine spontane Sekretion zytotoxischer Granula. Deren prinzipielle Fähigkeit zur Degranulation wurde deshalb durch die T-Zell-Rezeptor-unspezifische Stimulation der cTCR-transgenen T-Zellen mit PMA und Ionomycin (PMA/I) analysiert. Daraufhin konnte bei den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-positiven T-Zellen eine deutliche Steigerung der CD107a-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, ebenso bei den cTCR- $\alpha$ TRP2-positiven T-Zellen. Die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA zeigten die stärkste CD107a-Expression nach Co-Inkubation mit

K562\_KO/CSF2RA. Wenige der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA exprimierten CD107a auch nach Co-Inkubation mit der nicht CSF2RA-exprimierenden CML-Zelllinie K562\_KO. Der Anteil degranulierender, cTCR- $\alpha$ CSF2RA-positiver CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach Co-Inkubation mit NOMO-1 lag bei etwa einem Fünftel. Im Gegensatz dazu wurde durch die CO-Inkubation von CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen keine zusätzliche CD107a-Oberflächenexpression induziert. Der Anteil CD107a- und simultan cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierender T-Zellen war nach sechsständiger Co-Inkubation mit CD34<sup>+</sup> Zellen genauso hoch wie bei den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA ohne Stimulation durch Targets.

Die CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 wiesen im Vergleich zu den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA einen höheren Anteil an cTCR<sup>+</sup>/CD107a<sup>+</sup> Zellen auf, sowohl ohne Antigenkontakt als auch nach Co-Inkubation mit den TRP2-exprimierenden Targetzellen Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 und nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen resultierte nicht in einer abweichenden CD107a-Expression im Vergleich zu der spontanen Degranulation der cTCR-T-Zellen ohne Targetkontakt.



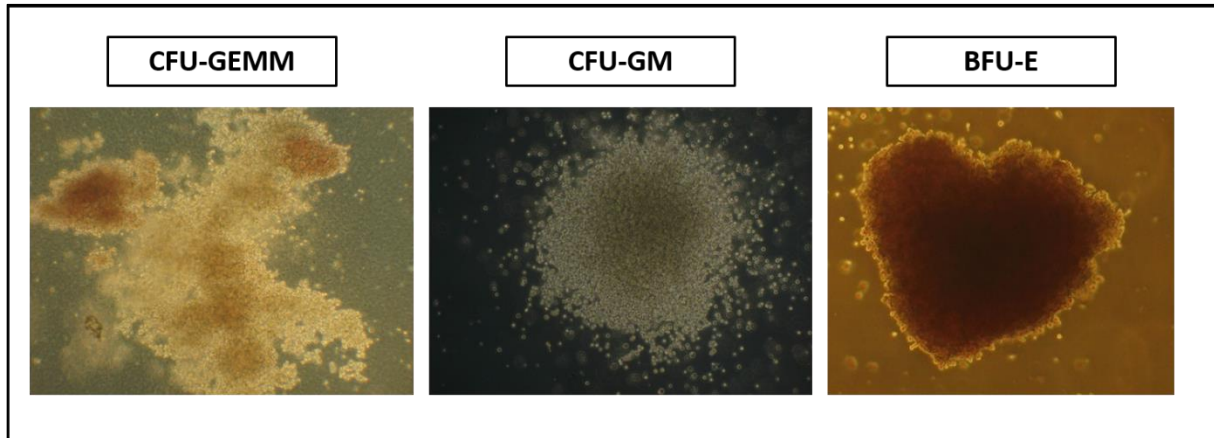
**Abbildung 19: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 1.** Der Nachweis der Sekretion lytischer Granula der cTCR-T-Zellen nach Kontakt mit verschiedenen Targetzellen (linksseitig angegeben) erfolgte über die durchflusszytometrische Bestimmung der CD107a-Expression auf cTCR<sup>+</sup> Leukapheresat-Zellen (CD107a<sup>+</sup>/cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup>) und ist in Orange dargestellt. Dasselbe ist in grauer Farbe für die gleichen Analysen mit cTCR- $\alpha$ TRP2<sup>+</sup> Leukapheresat-Zellen gezeigt. CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 wurden 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 über sechs Stunden mit den jeweiligen links angegebenen Targetzellen co-inkubiert. Es wurden jeweils 10<sup>5</sup> cTCR<sup>+</sup> Effektorzellen und 10<sup>5</sup> Targetzellen pro Ansatz eingesetzt (Effektor: Target-Verhältnis 1:1). CD107a-Expressionen wurden mit einem monoklonalen, PE-gekoppelten Antikörper gegen CD107a nachgewiesen, während die Expression der exogenen cTCRs mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen mTRAC analysiert wurde. Die CD107a-Expression von 1x10<sup>5</sup> cTCR<sup>+</sup> T-Zellen ist jeweils in Prozent angegeben. Die Expression des cTCR- $\alpha$ CSF2RA in der Effektorpopulation CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA lag zum Testzeitpunkt bei 85,1 %, die des cTCR- $\alpha$ TRP2 in der zugehörigen Effektorpopulation bei 61,8 % (nicht gezeigt). Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

#### 4.2.7 Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 1 gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Zur qualitativen Evaluation der zytotoxischen Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden humanen T-Zellen auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen wurden die transgenen T-Zellen 12 Tage nach Stimulation mit der Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA zur Durchführung eines Methylcellulose-Assays eingesetzt (**Abb. 21**). Hierfür wurden frisch aufgetaute und durch magnetische Isolation angereicherte CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 1 (**4.2.3**), die CSF2RA-positiven Targetzellen NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA sowie die CSF2RA-negativen K562\_KO zunächst über sechs Stunden mit den cTCR-T-Zellen co-inkubiert und anschließend in dem semisoliden Methylcellulosemedium MethoCult™ (**3.1.12**) kultiviert. Aufgrund von Vortests konnte davon ausgegangen werden, dass die Koloniebildung der Targetzellen nach der Überführung in das Methylcellulosemedium durch den Verbleib der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nicht über die gesamte Inkubationszeit hinweg beeinträchtigt wurde, da T-Zellen im verwendeten semisoliden Medium weder proliferierten noch länger als 24 Stunden überlebten (Daten nicht gezeigt). Mit den T-Zellen, die als Negativkontrolle den cTCR- $\alpha$ TRP2 exprimierten, wurde auf die gleiche Art und Weise wie mit den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA verfahren. Allerdings wurden die cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierenden T-Zellen lediglich mit den zuvor isolierten autologen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie der CSF2RA-positiven und TRP2-negativen AML-Zelllinie NOMO-1 co-inkubiert (**Abb. 21**). Die Koloniebildenden Einheiten der CD34<sup>+</sup> Zellen wurden im Falle beider untersuchter cTCRs nach einer Kultivierung von 14 Tagen manuell gezählt. Die Kolonien der NOMO-1, K562\_KO und K562\_KO/CSF2RA wurden aufgrund ihrer stärkeren Proliferation bereits nach 7 Tagen ausgezählt (**3.2.11**).

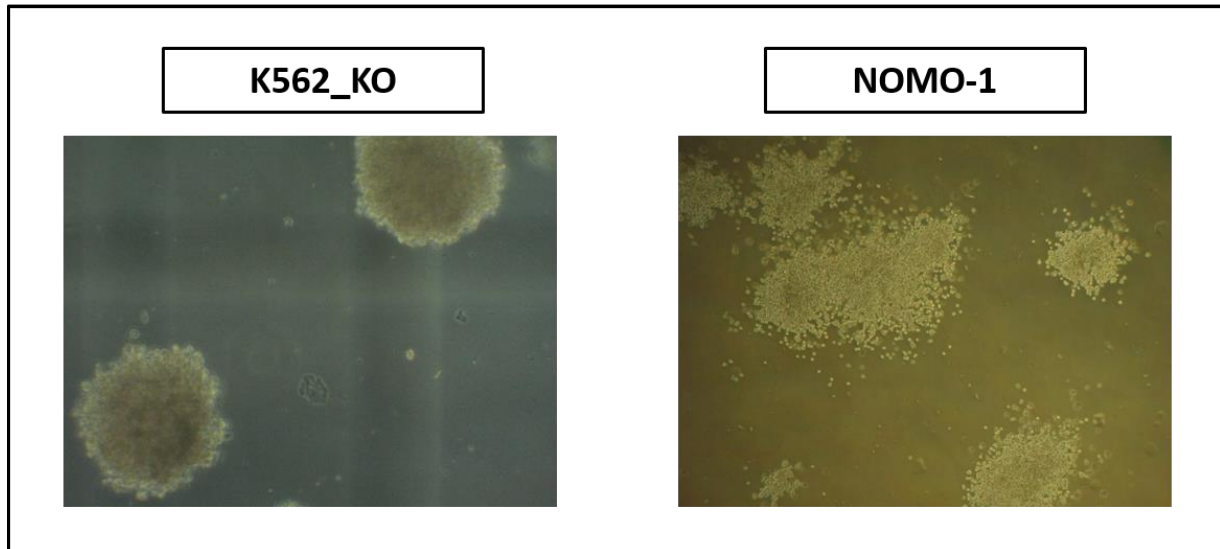
Beispielhaft sind im Folgenden die für 14 Tage im Koloniebildungstest kultivierten hämatopoetischen Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade des Spenders 1, ohne vorherige Co-Inkubation mit autologen transgenen T-Zellen, gezeigt (**Abb. 20**). Es konnten frühe hämatopoetische Vorläuferzellen identifiziert werden, die die Fähigkeit besaßen, zu Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten zu differenzieren (CFU-GEMM). Außerdem konnten Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) von Vorläuferzellen der Erythrozyten (BFU-E) abgegrenzt werden. Pro Testansatz wurden 1000 CD34<sup>+</sup> Zellen eingesetzt.

CFUs von CD34<sup>+</sup> Zellen, die mit autologen CSF2RA-TCR-transgenen Effektorzellen co-inkubiert worden waren, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Morphologie nicht von CFUs unbehandelter CD34<sup>+</sup> Zellen. Die aus den Spendern 2 und 3 isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurden auf gleiche Art und Weise analysiert und resultierten in CFUs in vergleichbarer Anzahl und mit vergleichbarem Aussehen. Daher sind in **Abb. 20** repräsentativ nur die CFUs des Spenders 1 bildlich dargestellt.



**Abbildung 20: Kolonie-bildende Einheiten verschiedener Differenzierungsstufen aus CD34<sup>+</sup> Zellen im Koloniebildungstest des Spenders 1.** Aus Leukapheresat des Spenders 1 isolierte CD34<sup>+</sup> Zellen wurden entweder unmittelbar oder nach sechsständiger Co-Inkubation mit cTCR-transgenen, autologen T-Zellen in Methylcellulosemedium kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die verschiedenen Kolonie-bildenden Einheiten (engl. Colony-Forming Units, CFU) in ihrer Gesamtheit gezählt. Dabei ließen sich Vorläuferzellen verschiedener Zellreihen und Differenzierungsgrade identifizieren. Die CFUs der Spender 2 und 3 entsprachen dem Aussehen der abgebildeten CFUs des Spenders 1. Abkürzungen: CFU-GEMM: Colony-forming Unit Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megacaryocyte; CFU-GM: Colony-forming Unit Granulocyte, Macrophage; BFU-E: Burst-forming Unit Erythroid.

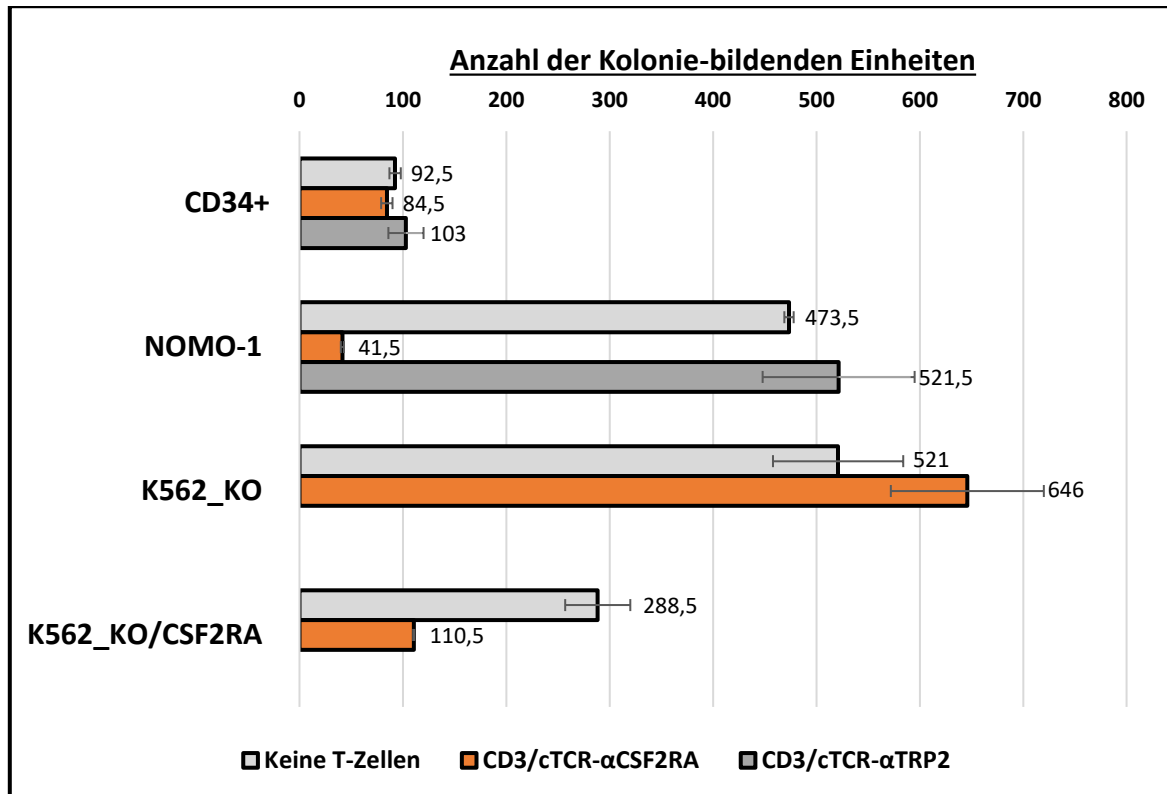
In **Abb. 21** sind die nach siebentägiger Kultivierung in Koloniebildungstests analysierten Leukämie-Kolonien der nicht mit cTCR-transgenen Effektorzellen co-kultivierten Targets NOMO-1 und K562\_KO dargestellt. Die Morphologie der K562\_KO/CSF2RA in den Koloniebildungstests entsprach der der K562\_KO und ist nicht zusätzlich gezeigt. Die Leukämiezelllinien wurden neben den autologen hämatopoetischen Zellen der Stammzellspender bezüglich ihrer Erkennung durch die transgenen T-Zellen getestet. Die CSF2RA-positiven Zelllinien NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA dienen als Positivkontrolle für cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen. Da auf den CD34<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch keine CSF2RA-Expression nachgewiesen werden konnte, dienten die CSF2RA-positiven Zellen als Beleg für die CSF2RA-spezifische Reaktivität der T-Zellen (**3.1.11.1**, **3.1.11.2**, **3.1.11.3**). Dementsprechend stellte die CSF2RA-negative Zelllinie K562\_KO die Negativ-Kontrolle dar. Die Kolonien der Kontroll-Targets, die über sechs Stunden mit den transgenen T-Zellen inkubiert worden waren, unterschieden sich morphologisch nicht von den Kolonien der Targets ohne Kontakt zu Effektorzellen. Jeder Testansatz mit CD34<sup>+</sup> enthielt 1000 der Targetzellen, wohingegen die übrigen Targets mit 2000 pro Testansatz ausgesät wurden. Das Effektor:Targetverhältnis war in jeder Kombination 1:1.



**Abbildung 21: Koloniebildungstest zur Beurteilung der Morphologie von Kolonien der AML-Zelllinie NOMO-1 und der CML-Zelllinie K562\_KO.** Vor der Evaluierung der Zytotoxizität von cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden T-Zellen des Spenders 1 wurden zunächst die als Positiv-Kontrollen eingesetzten CSF2RA-positiven Leukämiezelllinien NOMO-1, K562\_KO-CSF2RA (nicht gezeigt) und die als Negativ-Kontrolle eingesetzten K562\_KO ohne vorherige Co-Inkubation mit den Effektoren über 7 Tage in Methylcellulose-Medium kultiviert und anschließend manuell ausgezählt. Die Kolonien der NOMO-1 als auch die der K562\_KO bzw. K562\_KO/CSF2RA zeigten im Methylcellulose-Assay eine charakteristische Morphologie und ließen sich deutlich voneinander unterscheiden. Die beiden K562\_KO-Zelllinien bildeten kompakte, rundliche Kolonien, die NOMO-1 flächige, aufgelockert erscheinende Kolonien.

Im Koloniebildungstest zeigten die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 1 (**Abb. 22**) die ausgeprägteste zytotoxische Wirkung auf die natürlicherweise CSF2RA exprimierende AML-Zelllinie NOMO-1. Die Co-Inkubation mit den cTCR-CSF2RA-exprimierenden Effektoren verursachte eine Reduktion der Kolonienanzahl um 90 %. Auch die Anzahl an Kolonien der K562\_KO/CSF2RA-Zellen wurde durch die Co-Inkubation mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu hatte die Co-Inkubation der CSF2RA-negativen Zelllinie K562\_KO mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA keinerlei negative Auswirkungen auf die Koloniebildung der Targetzelllinie. Das Überleben der CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 1 wurde durch vorherige Co-Inkubation mit den autologen CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA kaum beeinträchtigt. Die CD34<sup>+</sup> Zellen bildeten ohne T-Zell-Kontakt 93 Kolonien und trotz sechsständiger Co-Inkubation mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA noch 85 Kolonien bei einer Ausgangszellzahl von 1000 CD34<sup>+</sup> Zellen.

cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierende T-Zellen des Spenders 1 hatten keinen Effekt auf das Überleben autologer CD34<sup>+</sup> Zellen und auch keinen Effekt auf das Überleben der TRP2-negativen AML-Zelllinie NOMO-1. Dies zeigte auch, dass von den cTCR-transgenen T-Zellen keine Alloreaktivität ausging.



**Abbildung 22: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR-αCSF2RA- und cTCR-αTRP2-exprimierender T-Zellen des Spenders 1.** Zur direkten Evaluierung der Zytotoxizität der CD3/cTCR-αCSF2RA (cTCR-Expression 79 %) gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden die transgenen T-Zellen des Spenders 1 über sechs Stunden mit verschiedenen Targetzellen co-inkubiert. Anschließend wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Als Positiv-Kontrollen der zytotoxischen Wirkung des cTCR-αCSF2RA dienten die CSF2RA-exprimierenden Targets NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA, als Negativ-Kontrolle die CSF2RA-negative Zelllinie K562\_KO. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der cTCR-αCSF2RA-spezifischen Zytotoxizität T-Zellen des Spenders 1 mit dem irrelevanten cTCR gegen TRP2 transduziert (cTCR-Expression 57,4 %) und mit den TRP2-negativen NOMO-1 und autologen CD34<sup>+</sup> Zellen co-inkubiert und anschließend in Koloniebildungstests getestet. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten der CD34<sup>+</sup> Zellen wurde nach 14 Tagen bestimmt, die der NOMO-1, K562\_KO und K562\_KO/CSF2RA nach 7 Tagen. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der Kolonie-bildenden Einheiten/Petrischale zweier identischer Ansätze dar. Hierbei handelt es sich um Ergebnisse zweier unabhängiger Zählungen. Hellgraue Balken: Koloniezahl ohne vorherige Co-Inkubation mit den Effektoren. Orangefarbene Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD3/cTCR-αCSF2RA. Dunkelgraue Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD3/cTCR-αTRP2. Es wurden 1000 CD34<sup>+</sup> Zellen und 2000 Zellen der weiteren Targets eingesetzt, Effektor: Target-Verhältnis:1:1.

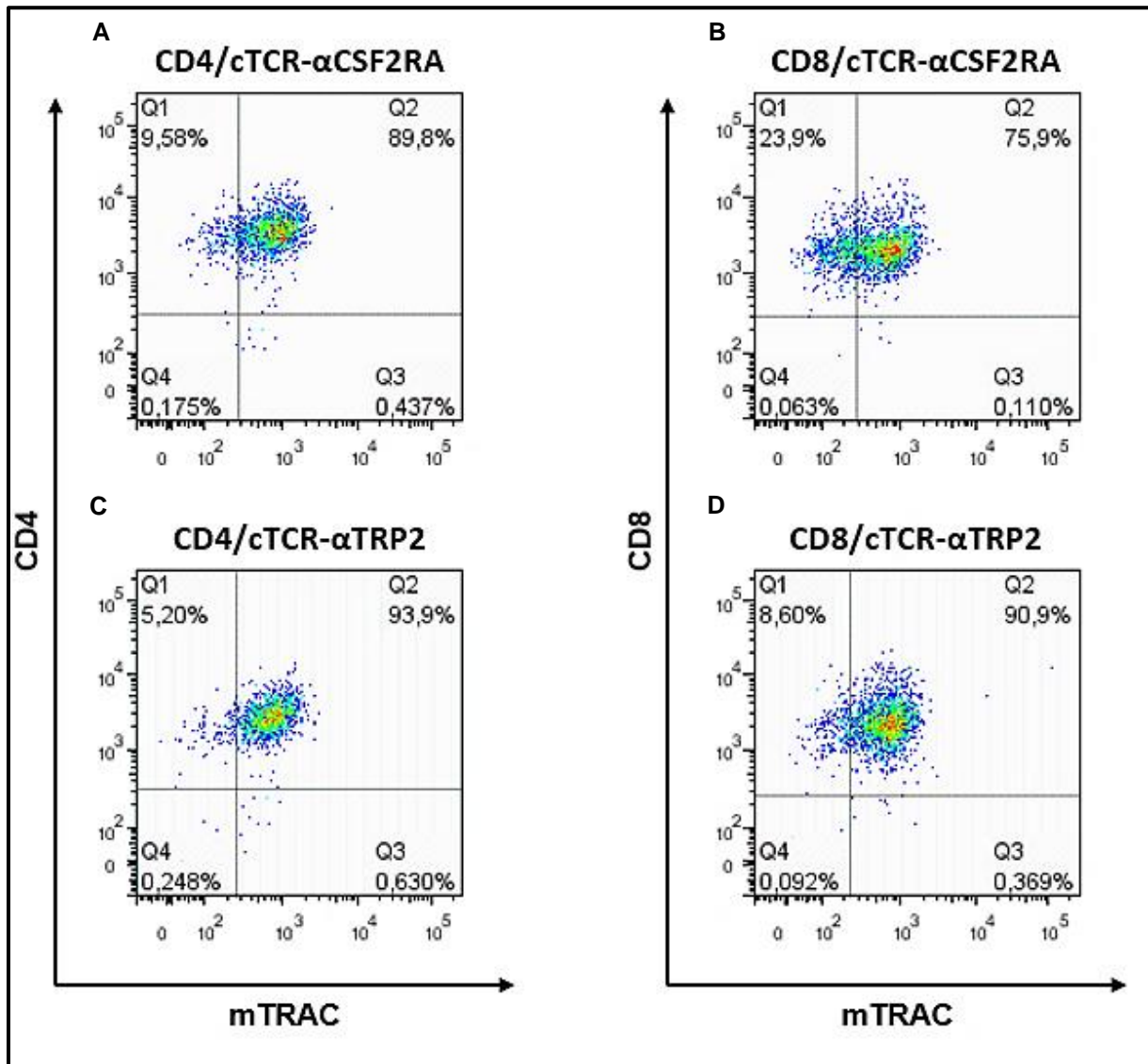
### 4.3 Spender 2

Der zweite Spender war im Gegensatz zu Spender 1, der an einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom erkrankt war, gesund und sammelte hämatopoetische Stammzellen für einen allogenen, erkrankten Stammzellempfänger. Zur spezifischeren Analyse der zytotoxischen Wirkung der transgenen T-Zellen wurden diese nach der Transduktion (**3.2.6.1**) mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA bzw. dem cTCR- $\alpha$ TRP2 mittels magnetischer Zellseparation nach den Oberflächenmolekülen CD4 und CD8 isoliert (**3.2.4**) und anschließend getrennt voneinander weiterkultiviert sowie in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, einem CD107a-Degranulations-Assay und einem Koloniebildungstest untersucht.

#### 4.3.1 Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 2 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren und Isolation transgener CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Auch bei Spender 2 erfolgte die retrovirale Transduktion der Leukapheresat-Zellen mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA oder dem cTCR- $\alpha$ TRP2 zwei Tage nach dem Auftauen der Proben (**3.2.6.1**). Um eine noch differenziertere Analyse der Reaktivität und der zytotoxischen Wirkung der CD8- und CD4-positiven T-Zell-Populationen vornehmen zu können, wurden die Leukapheresat-Zellen, eine Woche nachdem sie mit einem der beiden exogenen TCRs cTCR- $\alpha$ TRP2 oder cTCR- $\alpha$ CSF2RA transduziert worden waren, jeweils zur Isolation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch magnetische Zellseparation (**3.2.4**) herangezogen. Dadurch konnten schließlich vier transgene T-Zellpopulationen angereichert werden, (CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2, CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2), die anschließend im Rahmen aller für Spender 2 durchgeführten Experimente verwendet wurden. Nach der Separation wurden die cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und die cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierenden T-Zellen erneut mit den Melanomzelllinien Ma-Mel-86b/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b/TRP2 stimuliert und für weitere 12 Tage kultiviert. Während dieser Kultivierung wurden die transgenen T-Zellen mittels antibiotischer Selektion (Puromycin 1  $\mu$ g/ml) angereichert, bevor sie in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, einem CD107a-Degranulations-Assay und einem Koloniebildungstest eingesetzt wurden.

Die Reinheit der isolierten T-Zell-Populationen wurde mittels Durchflusszytometrie sichergestellt (**Abb. 23**). Über 99 % der jeweils isolierten T-Zell-Populationen exprimierten CD4 beziehungsweise CD8 auf ihrer Oberfläche. Bei 89,8 % der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte der exogene TCR auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (**Abb. 23 A**), während die transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen den cTCR- $\alpha$ CSF2RA zu 75,9 % auf der Zelloberfläche exprimierten (**Abb. 23 B**). Im Gegensatz dazu konnte bei 93,9 % der analysierten CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 eine cTCR/TRP2-Expression nachgewiesen werden (**Abb. 23 C**) sowie bei 90,9 % der CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 (**Abb. 23 D**).



**Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-Oberflächenexpression der isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2.** An Tag 10 nach retroviraler Transduktion der Leukapheresat-Zellen wurden die Oberflächenexpression des cTCR- $\alpha$ CSF2RA und des cTCR- $\alpha$ TRP2 sowie die Reinheit der nach CD4 und CD8 isolierten T-Zell-Populationen bestimmt. Die cTCR-Expression wurde mit einem FITC-markierten Antikörper gegen mTRAC nachgewiesen, die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 mittels PE-gekoppelter Antikörpern. Das Gating der gezeigten FACS-Daten wurde anhand von zusätzlich angefertigten IgG1-Isotykokontrollen (nicht gezeigt) festgelegt. **A:** Über 99 % der gemessenen Zellen exprimierten CD4, 89,8 % simultan den cTCR- $\alpha$ CSF2RA. **B:** Annähernd 100 % der T-Zellen exprimierten CD8, davon 75,9 % zusätzlich den cTCR- $\alpha$ CSF2RA. **C:** In der reinen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (>99 % CD4<sup>+</sup>) konnte bei 93,9 % der Zellen eine cTCR- $\alpha$ TRP2-Expression nachgewiesen werden. **D:** >99 % der Zellen waren CD8-positiv, 90,9 % exprimierten simultan den cTCR- $\alpha$ TRP2. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region.

#### 4.3.2 Isolation der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 2

Die CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurden mit Hilfe von magnetischen anti-CD34 MicroBeads aus den mit CD34<sup>+</sup> Zellen angereicherten Blutproben des gesunden Stammzellspenders 2 isoliert (**3.2.5**). Da die Zahl der durch die Isolation angereicherten vitalen, CD34<sup>+</sup> Zellen geringer war als für die folgenden Assays insgesamt benötigt wurde, war es nicht möglich, die Reinheit der nach dem Oberflächenmolekül CD34 isolierten Zellpopulation mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse zu analysieren. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die magnetische Zellseparation ebenso wie in allen vorherigen

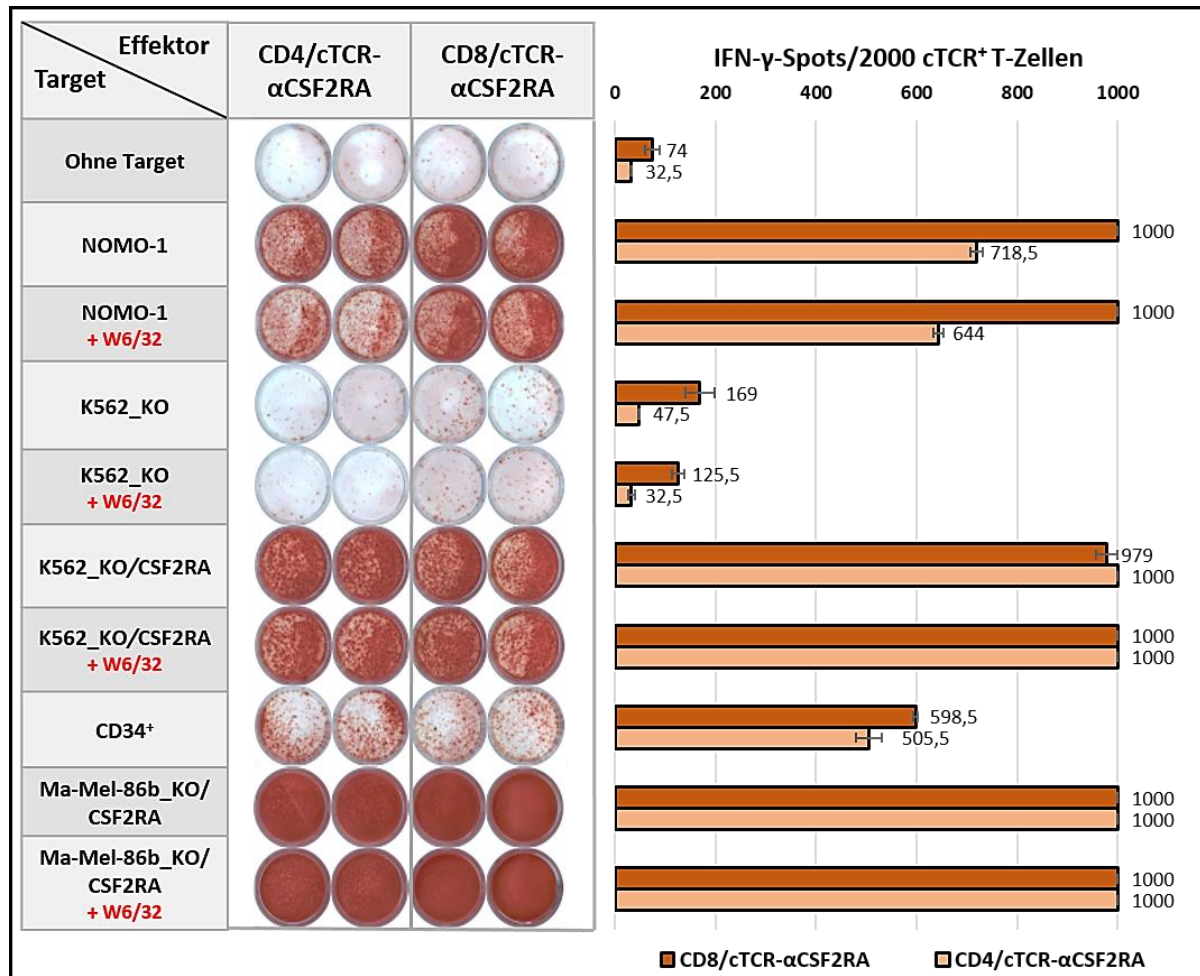


Experimenten **(4.2.3)**, in einer homogenen CD34<sup>+</sup> Zellpopulation aus den Proben des Spenders 2 resultierte.

#### 4.3.3 Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen durch cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2

Die CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und die CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden zur Überprüfung der jeweiligen cTCR-Spezifitäten 12 Tage nach Stimulation mit der Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zusammen mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen sowie weiteren Targets getestet (**Abb. 24**). Zum Nachweis der HLA-Klasse I-unabhängigen Erkennung der Targets durch die cTCR-transduzierten T-Zellen wurde die spezifische Erkennung der transgenen Effektoren zusätzlich mit dem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 blockiert.

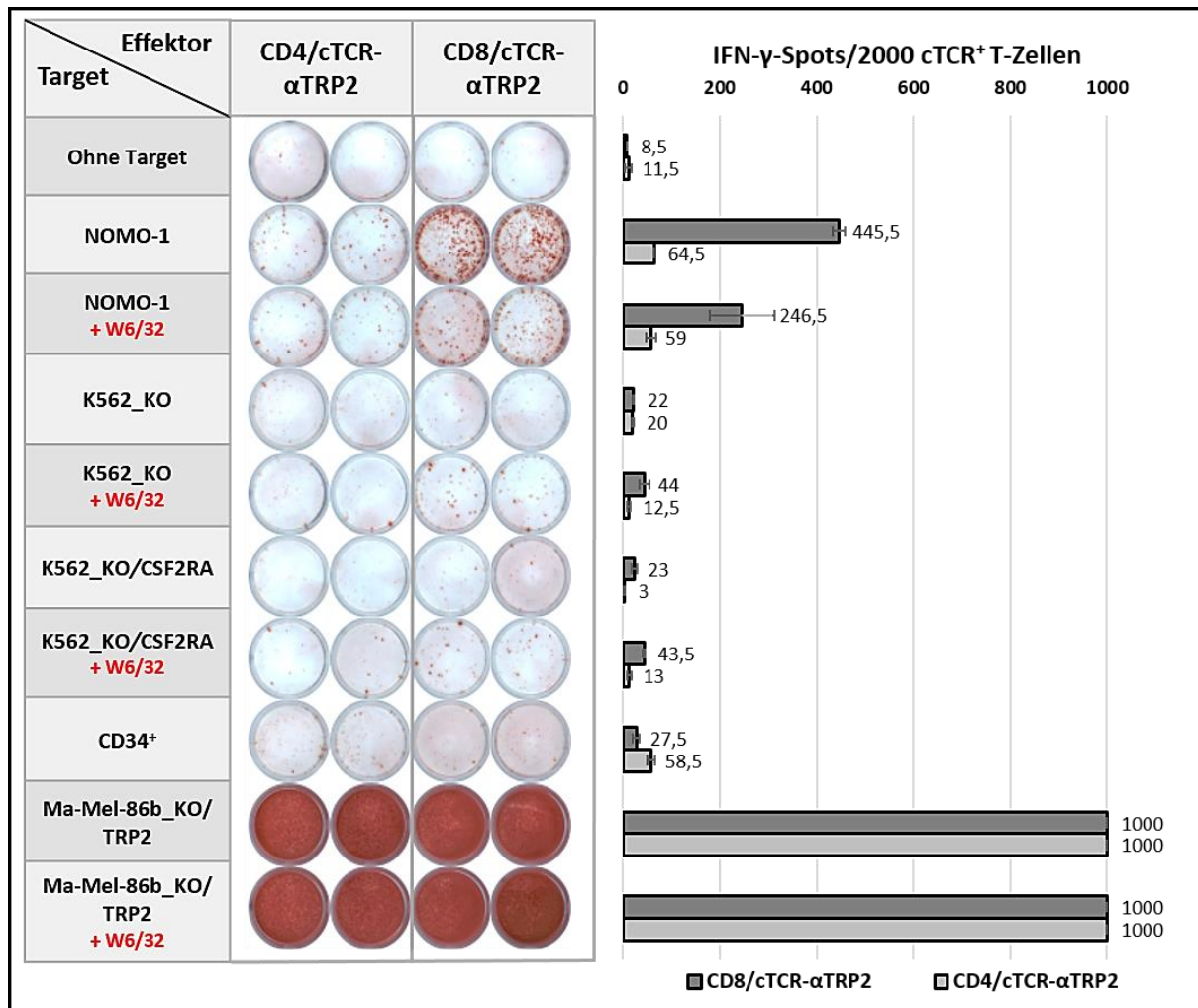
Die Ergebnisse des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays mit den CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA sind in **Abb. 24** dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Ohne die Co-Inkubation mit Targetzellen zeigten die CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und die CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA eine vernachlässigbare, jedoch höhere spontane IFN-gamma-Sekretion als die transgenen T-Zellen des Spenders 1 (**4.2.5**). Auch bei den übrigen Effektor-Target-Kombinationen wurde stets eine deutlich höhere Anzahl an IFN- $\gamma$ -Spots gemessen als im Rahmen der Analyse der cTCR-transgenen T-Zellen des Spenders 1 (**4.2.5**). Die Spotanzahl nach Co-Inkubation der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> mit der CSF2RA-positiven AML-Zelllinie NOMO-1 war höher als nach Zugabe des HLA-Klasse I-spezifischen Antikörpers W6/32. Dies weist auf eine Alloreaktivität der T-Zellen gegenüber der Leukämiezelllinie hin. Die Inkubation von NOMO-1-Zellen mit CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA resultierte in einer derart stark ausgeprägten IFN- $\gamma$ -Sekretion der T-Zellen, dass einzelne Spots innerhalb der analysierten Wells aufgrund der ausgesprochen hohen T-Zell-Aktivierung nicht mehr abgegrenzt werden konnten (TNTC, engl. too numerous to count). Deshalb wurde die gemessene Spotanzahl auf ein zuvor definiertes Maximum von 1000 Spots festgelegt (**3.2.8**). Eine vergleichbar hohe IFN- $\gamma$ -Sekretion war sowohl bei den CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA als auch bei den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nachweisbar, die mit den CSF2RA-positiven Targets K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA inkubiert worden waren. Auch durch Zugabe des HLA-Klasse I-spezifischen Antikörpers W6/32 konnte die Aktivierung beider cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden T-Zellpopulationen nicht reduziert werden. Die CSF2RA-negative CML-Zelllinie K562\_KO wurde nur geringfügig von den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA erkannt, jedoch wurde die detektierte Erkennung durch W6/32 kaum abgeschwächt. Im Falle der analysierten CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA konnte die Erkennung der K562\_KO nicht eindeutig nachgewiesen werden. Besonders auffällig war die IFN- $\gamma$ -Sekretion sowohl der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA als auch der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach der Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen, die bei den zuvor analysierten cTCR-T-Zellen des Spenders 1 nicht zu beobachten war (**4.2.5**). Aufgrund der hohen Anzahl toter hämatopoetischer Zellen nach dem Auftauprozess (**3.2.3**) war die Anzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen Vorläuferzellen des Spenders 2 nach der magnetischen Zellseparation so gering, dass die T-Zell-Erkennung in einem weiteren Ansatz nicht mit dem Antikörper W6/32 auf ihren HLA-Klasse I-unabhängigen Mechanismus überprüft werden konnte. Außerdem musste die eingesetzte Zellzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen von 50000 auf 30000 Zellen pro Well verringert werden. Die cTCR-transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten, außer bei K562\_KO/CSF2RA, durch Co-Inkubation mit den verschiedenen Targets generell einen höheren Grad an Aktivierung als die transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Doch auch bei Letzteren war eine eindeutige Erkennung der CSF2RA-exprimierenden Targets feststellbar.



**Abbildung 24: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2.** Nach retroviraler Transduktion der Leukapheresat-Zellen mit dem CSF2RA-spezifischen cTCR wurden jeweils CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den transgenen Leukapheresat-Zellen isoliert. Zwölf Tage nach Stimulation der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA wurde die spezifische Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen und weiterer Targets analysiert. Der HLA-unabhängige Mechanismus der Erkennung der verschiedenen Targets wurde zusätzlich durch Zugabe von W6/32, einem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper, analysiert. Es wurden pro Well 2000 cTCR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Effektoren), 30000 CD34<sup>+</sup> Zellen oder jeweils 50000 Zellen der übrigen Targets eingesetzt. 84,43 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten den cTCR- $\alpha$ CSF2RA sowie 75,09 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. **Links:** Original-Ergebnis des durchgeführten ELISpot-Assays. Die Targetzellen der verschiedenen Ansätze sind linksseitig aufgeführt, W6/32-Zugabe ist rot dargestellt. Die jeweiligen Effektoren sind oben genannt. Gezeigt sind jeweils Doppelwerte für jeden Ansatz. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde in Form von rotem Niederschlag (Spots) auf der Membran detektiert. Die Auszählung dieser Spots liegt dem rechtsseitigen Balkendiagramm zugrunde. **Rechts:** Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der IFN- $\gamma$ -Spots/Well von Doppelwerten (links) dar. Ansätze mit CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA als Effektoren sind in dunkler Farbe dargestellt, Ansätze mit CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA in heller.

Ebenso wie bei den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden T-Zellen des Spenders 2 zeigten nach Inkubation mit identischen Targetzellen auch die cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten (**Abb. 25**) CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchschnittlich eine höhere IFN- $\gamma$ -Ausschüttung als die CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Jedoch wurde bei den CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 im Vergleich zu den T-Zellen, die den CSF2RA-spezifischen TCR exprimierten, keine spontane IFN- $\gamma$ -Ausschüttung festgestellt. In den Testansätzen der CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2, die mit der TRP2-exprimierenden Melanomzelllinie Ma-Mel-86b/TRP2 inkubiert worden waren, wurde eine maximale T-Zell-Aktivierung mit jeweils über 1000 IFN- $\gamma$ -Spots detektiert. Diese konnte auch durch Zugabe des HLA-Klasse I-spezifischen Antikörpers W6/32 nicht abgeschwächt werden. Die AML-Zelllinie NOMO-1 wurde von CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 deutlich erkannt, obwohl sie TRP2

nicht exprimiert. Die Erkennung der NOMO-1 durch die CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 war nach Zugabe von W6/32 um etwa 50 % verringert. Dieses Ergebnis weist, ebenso wie die W6/32-Blockade, eindeutig auf eine Alloreaktivität der cTCR- $\alpha$ TRP2 transgenen T-Zellen gegenüber den NOMO-1-Zellen hin. Im Vergleich zur Reaktivität gegen das spezifische Target Ma-Mel-86b/TRP2 ist diese jedoch nahezu vernachlässigbar. Bei den übrigen Effektor-Target-Kombinationen waren kaum mehr IFN- $\gamma$ -Spots messbar als bei den cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ohne Target-Inkubation. Insbesondere die autologen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden weder durch die CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 noch durch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen/cTCR- $\alpha$ TRP2 erkannt.



**Abbildung 25: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2.** Nach magnetischer Zellseparation der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Leukapheresat-Zellen, die zuvor mit dem cTCR- $\alpha$ TRP2 transduziert worden waren, wurden die T-Zellen mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 stimuliert. Zwölf Tage nach der spezifischen T-Zell-Stimulation wurde die Erkennung der autologen CD34<sup>+</sup> Zellen und weiterer Targets analysiert. Zum Nachweis einer möglichen HLA-Klasse I-unabhängigen Erkennung der Targets wurde jede Effektor-Target-Kombination zusätzlich durch Zugabe von W6/32, einem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper, analysiert. Es wurden 2000 cTCR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Effektoren) mit 30000 CD34<sup>+</sup>Zellen oder 50000 Zellen der übrigen Targets co-inkubiert. 90,26 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten den cTCR- $\alpha$ TRP2 sowie 88,31 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. **Links:** Original-Ergebnis des durchgeführten ELISpot-Assays. Die Targets der verschiedenen Ansätze sind links aufgeführt, die W6/32-Zugabe ist rot dargestellt. Effektoren sind jeweils oben benannt. Gezeigt sind jeweils Doppelwerte eines jeden Ansatzes. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde in Form von rotem Niederschlag (Spots) auf der Membran detektiert. Die Auszählung dieser Spots liegt dem rechtsseitigen Balkendiagramm zugrunde. **Rechts:** Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der IFN- $\gamma$ -Spots/Well von Doppelwerten dar. Ansätze mit CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 als Effektoren sind in Dunkelgrau dargestellt, Ansätze mit CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 in Hellgrau.

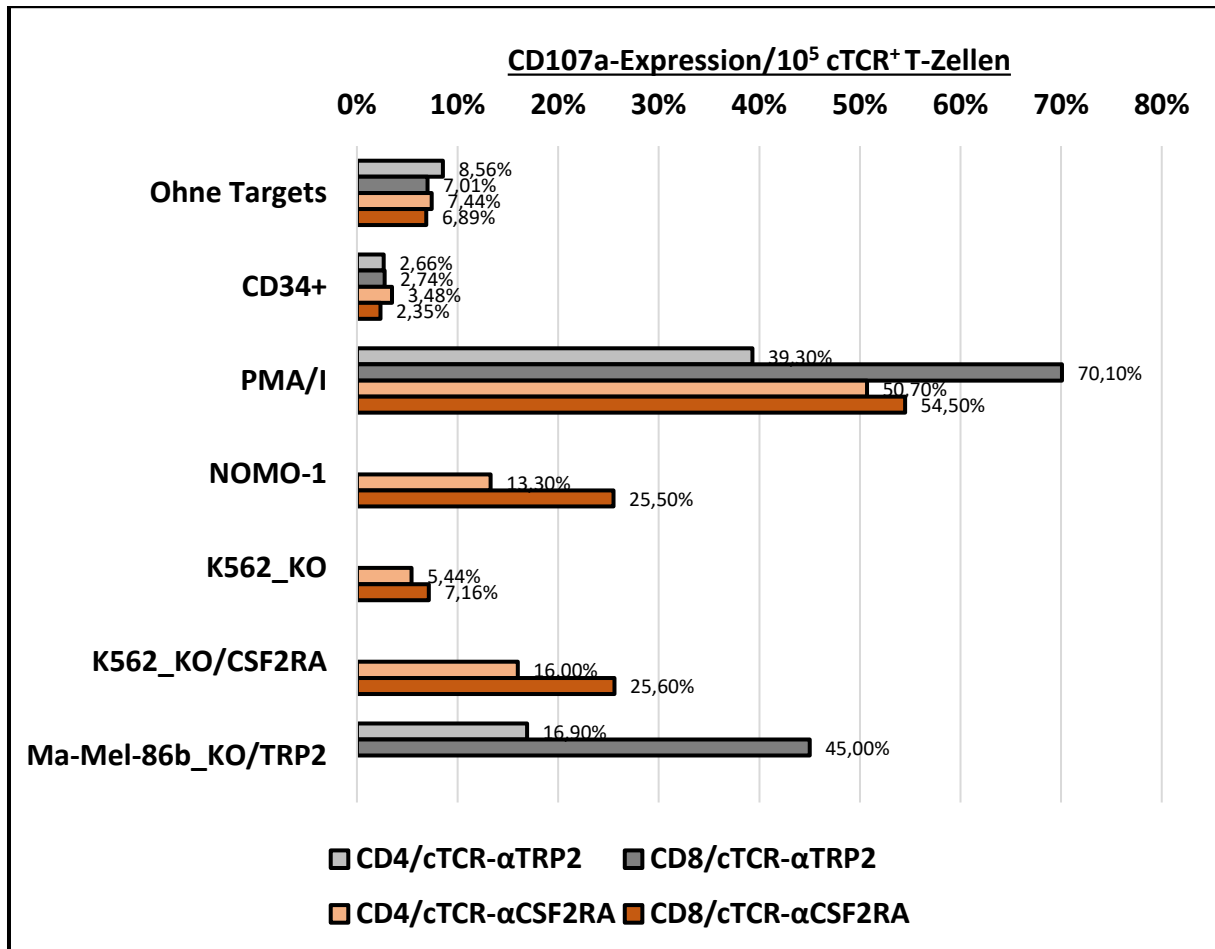
Ebenso wie im Zuge des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen des Spenders 2 konnten für die Analyse der Reaktivität der cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierenden T-Zellen lediglich 30000 CD34<sup>+</sup> Zellen pro Well verwendet werden. Auf eine zusätzliche HLA-Klasse I-Blockade mit W6/32 musste aufgrund der ungenügenden Zellzahl verzichtet werden.

#### 4.3.4 CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2 durch Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Die Auswertung des CD107a-Degranulations-Assays des Spenders 2 (**Abb. 26**) erfolgte nach dem in **4.2.6** dargestellten Schema. Spontan zeigten die cTCR-exprimierenden CD8<sup>+</sup> als auch die transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2, ähnlich wie in den IFN- $\gamma$ -ELISpots (**4.3.3**), unabhängig von dem exprimierten cTCR ein geringes Maß an CD107a-Oberflächenexpression. Im Vergleich zur CD107a-Expression der transgenen T-Zellen des Spenders 1 (**4.2.6**) wurde im Falle der untersuchten T-Zellen des Spenders 2 ein etwas höheres Maß an spontaner Aktivierung, hier im Sinne der Sekretion lytischer Granula, ohne vorherige Co-Inkubation mit Targets festgestellt. Die CD107a-Expression ohne Targetkontakt lag jedoch sowohl bei den CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, als auch den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, den CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 sowie den CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 unter 10%. Die unspezifische Aktivierung der cTCR-positiven T-Zellen mit PMA/Ionomycin resultierte bei etwa der Hälfte der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, bei etwa 40 % der CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und bei 70 % der CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 in einer CD107a-Oberflächenexpression.

Nach Inkubation der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen mit der CSF2RA-negativen CML-Zelllinie K562\_KO war der Anteil an CD107a<sup>+</sup>/cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen bei den CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA vergleichbar mit der gemessenen spontanen Degranulationsrate. Im Gegensatz dazu konnte nach Co-Inkubation der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen mit den CSF2RA-exprimierenden K562\_KO/CSF2RA-Zellen eine erheblich gesteigerte CD107a-Expression an der Zelloberfläche der cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Der Anteil an degranulierenden cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen fiel nach Co-Inkubation mit der natürlicherweise CSF2RA-exprimierenden AML-Zelllinie NOMO-1 vergleichbar aus. Die Präsenz CD34<sup>+</sup> Zellen hingegen induzierte weder im Fall der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA noch der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA die Sekretion zytotoxischer Granula.

Auch bei den CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 und den CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 konnte nach Co-Inkubation mit den autologen CD34<sup>+</sup> Zellen keine erhöhte CD107a-Oberflächenexpression festgestellt werden. Die Degranulationsfähigkeit der cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierenden T-Zellen wurde jedoch mithilfe der unspezifischen Aktivierung durch PMA/Ionomycin und der cTCR-spezifischen Stimulation durch die TRP2-exprimierende Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 zweifelsfrei in Form einer deutlich gesteigerten CD107a-Expression nachgewiesen. Im Allgemeinen wurde die CD107a-Oberflächenexpression nach jeweiligem Antigenkontakt auf CD8<sup>+</sup> cTCR-transgenen T-Zellen deutlich mehr gesteigert als auf CD4<sup>+</sup> cTCR-transgenen T-Zellen. Dies konnte bei T-Zellen, die den cTCR- $\alpha$ CSF2RA exprimierten, aber auch bei denjenigen, die den cTCR- $\alpha$ TRP2 exprimierten, gleichermaßen beobachtet werden.

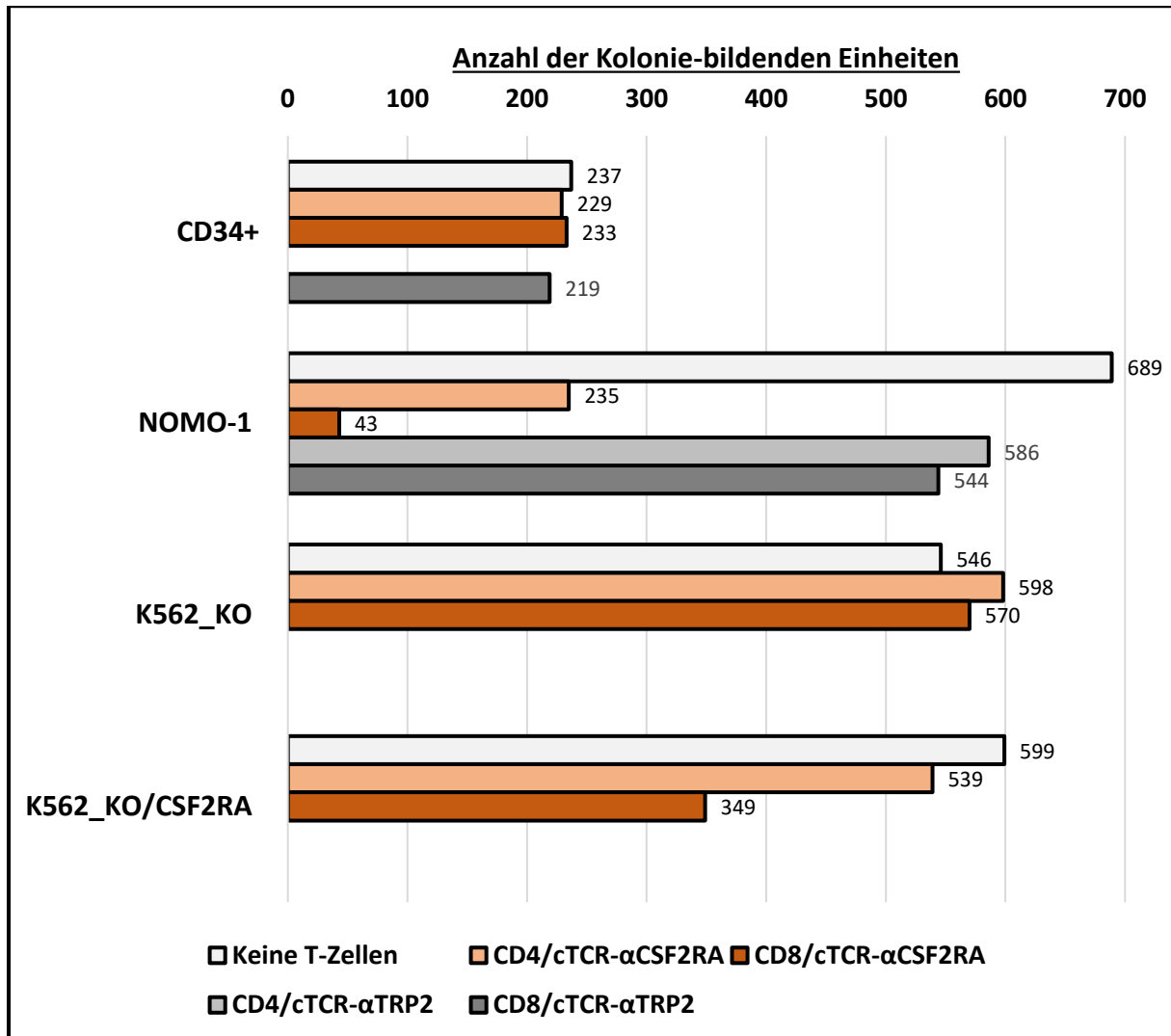


**Abbildung 26: CD107a-Degranulations-Assay mit CD4/cTCR-αCSF2RA, CD8/cTCR-αCSF2RA, CD4/cTCR-αTRP2 und CD8/cTCR-αTRP2 des Spenders 2.** Zum Nachweis der Sekretion lytischer Granula der transgenen T-Zellen nach Kontakt mit verschiedenen Targetzellen (linksseitig abgebildet) wurde die CD107a-Expression durchflusszytometrisch bestimmt und ist bezogen auf die transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Hellorange/Hellgrau dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in Dunkelorange/Dunkelgrau abgebildet. Die cTCR-αCSF2RA- und cTCR-αTRP2-transduzierten T-Zellen wurden 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA oder Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 über sechs Stunden mit den jeweiligen Targetzellen coinkubiert. Es wurden jeweils 10<sup>5</sup> cTCR<sup>+</sup> Effektorzellen und 10<sup>5</sup> Targetzellen pro Ansatz eingesetzt (Effektor: Target-Verhältnis 1:1). CD107a-Expressionen wurden mit einem monoklonalen, PE-gekoppelten Antikörper gegen CD107a nachgewiesen und jeweils als Prozentsatz aller für den jeweiligen Ansatz analysierten cTCR<sup>+</sup> T-Zellen angegeben. Die Expression der cTCRs wurde mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen mTRAC verifiziert. Die cTCR-αCSF2RA-Expression lag zum Testzeitpunkt bei den CD4/cTCR-αCSF2RA bei 84,7 %, bei den CD8/cTCR-αCSF2RA bei 75,1 %. Die cTCR-αTRP2-Expression der CD4/cTCR-αTRP2 lag bei 90,2 % und bei den CD8/cTCR-αTRP2 bei 88,3 %. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

#### 4.3.5 Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 2 gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Das Prozedere sowie die eingesetzten Targets innerhalb des Koloniebildungstests mit den CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 2 entsprachen denen des Koloniebildungstests des Spenders 1 (**4.2.7**). Auch in diesem Assay mit T- und CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 2 wurde die zytotoxische Wirkung der cTCR-transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der der cTCR-transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen sowie weiteren Targets separat analysiert. Die Auswertung des Koloniebildungstests (**Abb. 27**) wies im Vergleich zu den jeweiligen CD4<sup>+</sup> transgenen T-Zellen eine ausgeprägtere zytotoxische Wirkung der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA durch die sechsstündige Co-Inkubation mit den CSF2RA-exprimierenden Targets NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA nach. Im Falle der analysierten CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA hingegen war die zytotoxische Wirkung nach Inkubation mit NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA deutlich geringer als die der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA. Wie auch im Koloniebildungstest des zuvor untersuchten Spenders 1 (**4.2.7**) wurde also die Koloniezahl der NOMO-1 sowohl durch die transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch durch die transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2 im Vergleich zu den übrigen Targets am stärksten dezimiert. Im Gegensatz zu den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA beeinflussten die CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA die Koloniebildung der K562\_KO/CSF2RA kaum. Die Koloniebildung der CD34<sup>+</sup> Zellen wurde weder durch die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch durch die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen negativ beeinflusst.

Sowohl die CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 als auch die CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 zeigten im Vergleich zu den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen T-Zellen eine nur geringfügige zytotoxische Wirkung auf die CSF2RA-positive, TRP2-negative AML-Zelllinie NOMO-1. Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten der autologen CD34<sup>+</sup> Zellen, die mit den CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 co-inkubiert worden waren, wurde nur unwesentlich reduziert. Das üblicherweise semi-solide MethoCult™-Medium (**3.1.12**) des Testansatzes derjenigen CD34<sup>+</sup> Zellen, die mit CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 co-inkubiert worden waren, war zum Zeitpunkt der Auswertung erheblich flüssiger als in den restlichen Ansätzen. Es bildeten sich also keine unterscheidbaren Kolonien. Aus diesem Grund konnte diese Probe nicht ausgewertet werden.



**Abbildung 27: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR-αCSF2RA-exprimierender CD4- und CD8-positiver T-Zellen des Spenders 2 gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen.** Die direkte Analyse der Zytotoxizität CD4- und CD8-positiver, cTCR-αCSF2RA-transduzierter T-Zellen gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte nach sechsständiger Co-Inkubation der CD34<sup>+</sup> Zellen mit den jeweiligen T-Zellen. Zum Testzeitpunkt lag die cTCR-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei 84,43 %, während 75,09 % der analysierten transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen den exogenen TCR exprimierten. Nach dem gleichen Procedere wurde die zytotoxische Wirkung auf die CSF2RA-positiven Targets NOMO-1, K562\_KO/CSF2RA und das CSF2RA-negative Target K562\_KO evaluiert. Um die Spezifität der cTCR-αCSF2RA-vermittelten Zytotoxizität zu überprüfen, wurden zusätzlich CD4- und CD8-positiv T-Zellen, die mit dem irrelevanten TCR gegen TRP2 ausgestattet wurden, auf die gleiche Art und Weise analysiert. Jedoch wurden die cTCR-αTRP2-transduzierten T-Zellen lediglich hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber der TRP2-negativen NOMO-1-Zelllinie und den autologen CD34<sup>+</sup> Zellen untersucht. Zum Testzeitpunkt lag die cTCR-αTRP2-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei 90,26 %, während 88,34 % der analysierten transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen den exogenen TCR exprimierten. Die Bestimmung der CFUs der CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte nach 14, die der übrigen Targets nach 7 Tagen. Es wurden 1000 CD34<sup>+</sup> Zellen und 2000 Zellen der weiteren Targets eingesetzt, Effektor: Target-Verhältnis 1:1. Weiße Balken: Koloniezahl ohne vorherige Co-Inkubation mit cTCR-T-Zellen. Hellorangefarbene Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD4/cTCR-αCSF2RA. Dunkelorangefarbene Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD8/cTCR-αCSF2RA. Hellgraue Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD4/cTCR-αTRP2. Dunkelgraue Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD8/cTCR-αTRP2.

## 4.4 Spender 3

Spender 3 war, wie auch Spender 2, gesund, sodass die Sammlung der seiner hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut also im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation erfolgte.

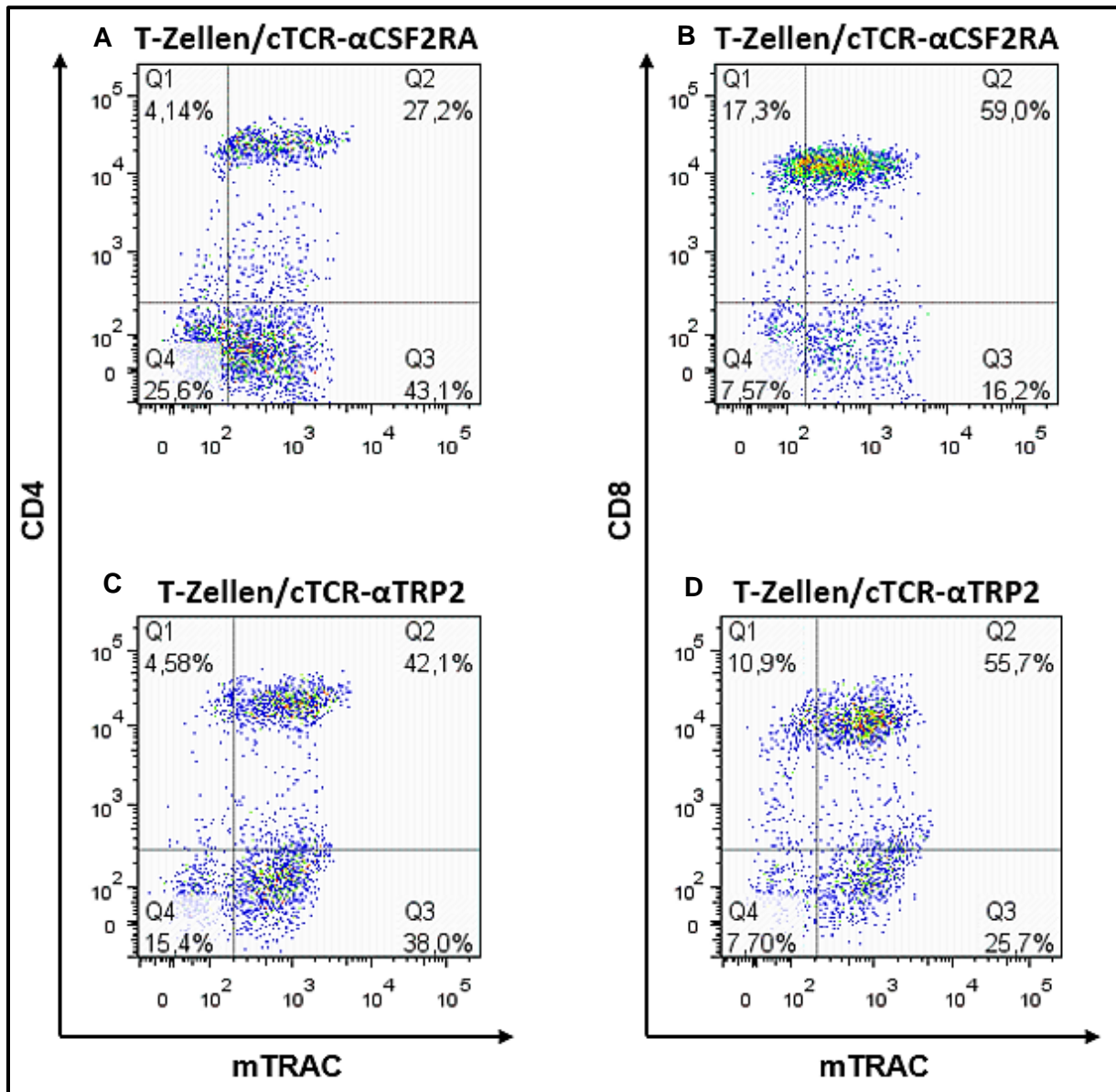
### 4.4.1 Retrovirale Transduktion der Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 3 mit CSF2RA- und TRP2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Die Analyse der zytotoxischen Wirkung der T-Zellen aus Leukapheresat-Zellen, die den cTCR- $\alpha$ CSF2RA exprimierten, auf autologe CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen, erfolgte bei Spender 3 nach dem gleichen Vorgehen wie für Spender 1 beschrieben (**4.2.2**). Auch bei Spender 3 wurden Leukapheresat-Zellen retroviral mit den HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptoren gegen CSF2RA oder TRP2 transduziert (**3.2.6.1**). Anschließend wurden, vor der Durchführung des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, des CD107a-Degranulations-Assays und des Koloniebildungstests, zusätzlich zur cTCR-Expression die Anteile der CD4- und CD8-positiven T-Zell-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 28**).

Die T-Zellen, die mit dem HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptor gegen CSF2RA transduziert worden waren, exprimierten 12 Tage nach Stimulation mit der CSF2RA-positiven Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA etwa zu 30 % den Oberflächenmarker CD4. Bei etwa einem Drittel der transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte zusätzlich die Expression des cTCR- $\alpha$ CSF2RA nachgewiesen werden (**Abb. 28 A**). Etwa 70 % der analysierten T-Zellen exprimierten CD8 auf ihrer Zellmembran, davon exprimierten wiederum 59 % den cTCR- $\alpha$ CSF2RA (**Abb. 28 B**). Insgesamt lag die cTCR- $\alpha$ CSF2RA Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei 63,7 % (Daten nicht gezeigt).

Im Fall der cTCR- $\alpha$ TRP2-transgenen Zellen konnte bei etwa 40 % aller Zellen eine CD4-Oberflächenexpression verifiziert werden, wovon etwa die Hälfte zusätzlich den exogenen TCR exprimierte (**Abb. 28 C**). Ungefähr 60 % der analysierten Zellen waren CD8-positiv (**Abb. 28 D**) und bei der Hälfte der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde der cTCR- $\alpha$ TRP2 nachgewiesen. Die cTCR-Expression der CD3<sup>+</sup> T-Zellen lag bei 78,1 % (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der cTCR-, CD4- und CD8-Oberflächenexpression der T-Zellen des Spenders 3.** Zwölf Tage nach retroviraler Transduktion der T-Zellen des Spenders 3 mit den HLA-unabhängigen cTCRs gegen CSF2RA und TRP2 und Stimulation mit Mal-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Mal-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die Oberflächenexpression der exogenen TCRs sowie der Anteil CD4- und CD8-positiver T-Zellen in beiden cTCR-transgenen T-Zell-Populationen bestimmt. Die cTCR-Expression wurde mithilfe eines FITC-gekoppelten Antikörpers gegen mTRAC nachgewiesen, während die CD4- und CD8-Expression jeweils mittels eines PE-gekoppelten Antikörpers untersucht wurde. Das Gating der gezeigten FACS-Daten wurde anhand von zusätzlich angefertigten IgG1-Isotypkontrollen (nicht gezeigt) festgelegt. **A/B:** 27,2 % der gemessenen T-Zellen exprimierten CD4 und den cTCR-αCSF2RA auf ihrer Zelloberfläche. Auf 59 % der Zellen konnte sowohl eine CD8- als auch eine cTCR-αCSF2RA-Expression detektiert werden. **C/D:** 42,1 % der T-Zellen exprimierten CD4 und gleichzeitig cTCR-αTRP2. Bei 55,7 % der gemessenen Zellen wurde eine Oberflächenexpression von cTCR-αTRP2 und CD8 verifiziert. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

#### 4.4.2 Isolation der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Leukapheresat des Spenders 3

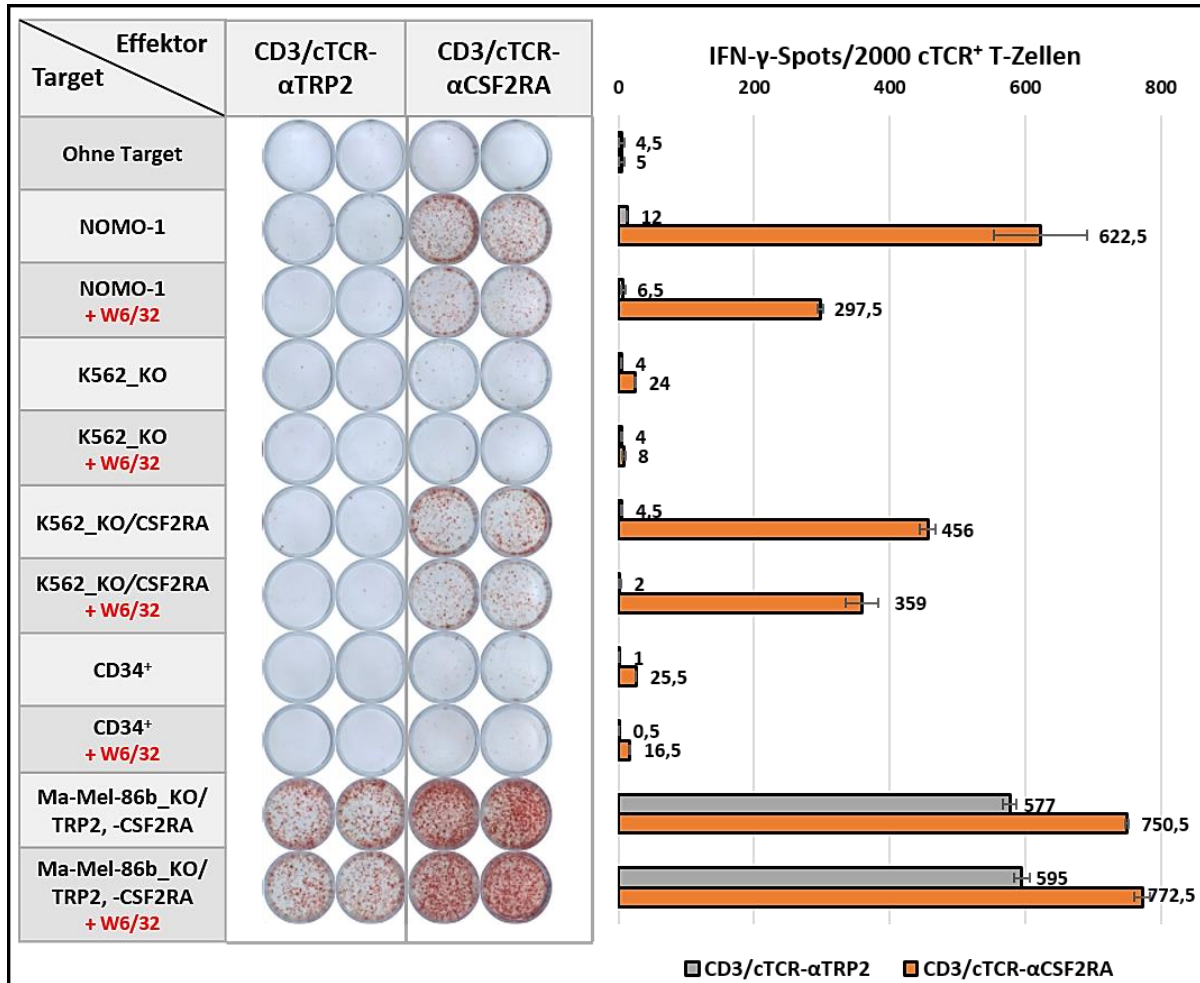
Die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden unmittelbar vor der Durchführung des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, des CD107a-Degranulations-Assays und des Koloniebildungstests aus den frisch aufgetauten, mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen angereicherten Proben des Spenders 3 mittels magnetischer Zellseparation durch anti-CD34 MicroBeads (**3.2.5**) isoliert. Aufgrund der geringen Anzahl vitaler CD34<sup>+</sup> Zellen in der Leukapheresatprobe konnte, wie bereits bei Spender 2 und im Gegensatz zu Spender 1, die Reinheit der isolierten CD34<sup>+</sup> Zellpopulation vor Verwendung in den nachfolgenden Assays (**4.2.3**) nicht mithilfe der Durchflussszytometrie analysiert werden.

#### 4.4.3 Interferon-gamma-ELISpot-Assay zur Überprüfung der Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen durch cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen des Spenders 3

Die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden zur Überprüfung ihrer Spezifität 12 Tage nach Stimulation mit der Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay auf die Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen sowie weiterer Targets getestet (**Abb. 29**). Zum Nachweis der HLA-Klasse I-unabhängigen Erkennung der Targets durch die cTCR-transduzierten T-Zellen wurde die spezifische Erkennung der transgenen Effektoren zusätzlich mit dem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 blockiert. Als Negativkontrolle wurden bei Spender 3, wie auch bei Spender 1 und 2, zusätzlich T-Zellen mit einem irrelevanten, HLA-unabhängigen cTCR gegen TRP2 transduziert und deren Reaktivität gegenüber den zuvor beschriebenen Targets anschließend ebenfalls im Rahmen eines IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays analysiert (**Abb. 29**).

Beide cTCR-transgenen T-Zell-Populationen zeigten, unabhängig von dem exprimierten, exogenen T-Zell-Rezeptor, in Abwesenheit etwaiger Targetzellen keine spontane IFN- $\gamma$ -Sekretion. Die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA erkannten mit deutlich die natürlicherweise CSF2RA-positive AML-Zelllinie NOMO-1 sowie die CSF2RA-transduzierten Zelllinien K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA. Die Erkennung der Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA durch die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA konnte im Gegensatz zur Erkennung der anderen CSF2RA-positiven Tumor-Zelllinien NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA nicht durch den HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 blockiert werden. Diese Ergebnisse weisen auf alloreaktive T-Zellen innerhalb der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen T-Zell-Population hin. Dennoch ließ sich nach W6/32-Blockade noch immer ein großer Anteil CSF2RA-spezifischer Reaktivität nachweisen. Die CSF2RA-negative CML-Zelllinie K562\_KO wurde von CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nicht erkannt. Auch durch die Inkubation der CD34<sup>+</sup> Zellen mit den autologen CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden Effektorzellen nicht zur IFN-gamma Sekretion angeregt.

Die CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 erkannten, HLA-Klasse I-unabhängig, die TRP2-exprimierende Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Im Gegensatz dazu induzierte die Co-Inkubation mit CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 3 sowie mit den übrigen, TRP2-negativen Targets NOMO-1, K562\_KO und K562\_KO/CSF2RA keine IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2. Ähnlich wie zuvor bereits für die Analyse des zweiten Spenders beschrieben (**4.3.2**) konnte auch im Fall des Spenders 3 nur eine geringe Menge an CD34<sup>+</sup> Zellen aus den Leukapheresatproben isoliert werden. Folglich wurde für den durchgeführten IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay des Spenders 3 nur eine Anzahl von 30000 CD34<sup>+</sup> Zellen pro Well eingesetzt. Die Zahl der übrigen Targets betrug hingegen weiterhin 50000 pro Well.



**Abbildung 29: IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay zum Nachweis der Spezifität und HLA-unabhängigen Erkennung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA- und cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierten T-Zellen des Spenders 3.** Zwölf Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde deren spezifische Erkennung autologer CD34<sup>+</sup> Zellen und weiterer Kontroll-Targets untersucht. Zur Analyse der HLA-Klasse I-unabhängigen Targeterkennung wurde jede Effektor-Target-Kombination zusätzlich mit Zugabe von W6/32, einem HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper, getestet. Es wurden 2000 cTCR<sup>+</sup> T-Zellen (Effektoren) mit 30000 CD34<sup>+</sup> bzw. 50000 Zellen der übrigen Targets eingesetzt. Die cTCR-Expression der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA lag bei 63,7 % und die der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 bei 78,1 %. **Links:** Original-Ergebnis des durchgeführten ELISpot-Assays. Die Targetzellen der verschiedenen Ansätze sind links aufgeführt, W6/32-Zugabe ist rot dargestellt. Die jeweiligen Effektoren sind oben genannt. Gezeigt sind jeweils Doppelwerte jedes einzelnen Ansatzes. Die IFN- $\gamma$  Sekretion konnte in Form von rotem Niederschlag, sogenannten Spots, auf der Membran detektiert werden. Die Auszählung dieser Spots liegt dem Balkendiagramm (rechts) zugrunde. **Rechts:** Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der zugrundeliegenden und links aufgeführten IFN-gamma-Spots/Well von Doppelwerten dar. Ansätze, die CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 als Effektoren enthielten sind in Grau dargestellt, Ansätze mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA in Orange.

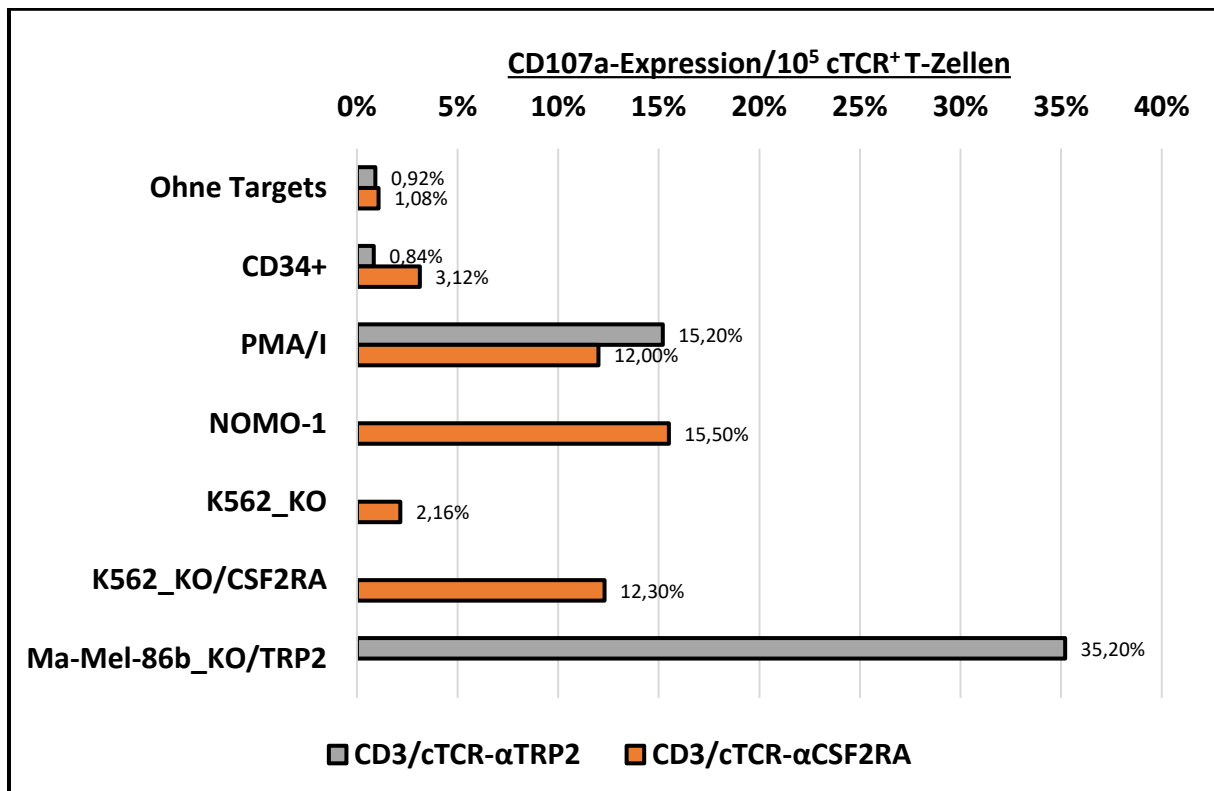
#### 4.4.4 CD107a-Degranulations-Assay zur indirekten Evaluation der zytotoxischen Aktivität cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 3 durch Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Die Ergebnisse des CD107a-Degranulations-Assays des Spenders 3 (**Abb. 30**) verdeutlichen, dass die analysierten transgenen T-Zellen von Spender 3 insgesamt ein geringeres Maß an Degranulation zeigten als die der zuvor analysierten Spender 1 (**4.2.6**) und 2 (**4.3.4**).

Sowohl im Fall der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA als auch der T-Zellen, die zum Vergleich mit dem cTCR- $\alpha$ TRP2 transduziert worden waren, degranulierten spontan nur etwa 1 % der cTCR-

positiven Zellen. Nach sechsstündiger Co-Inkubation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA mit der CSF2RA-positiven AML-Zelllinie NOMO-1 exprimierten 15,5 % der cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> Effektoren das lysosomale Membranmolekül CD107a auf ihrer Zelloberfläche. Die Co-Inkubation der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen T-Zellen mit der CSF2RA-exprimierenden CML-Zelllinie K562\_KO/CSF2RA resultierte, ebenso wie mit den unspezifischen T-Zell-Stimulatoren PMA/Ionomycin, bei einem vergleichbaren Anteil cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen in der Sekretion lytischer Granula. Im Gegensatz dazu konnte nach Inkubation mit CSF2RA-negativen K562\_KO-Zellen keine erhöhte CD107a-Expression auf der Zelloberfläche der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nachgewiesen werden. Auch die autologen CD34<sup>+</sup> Zellen induzierten bei den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen durch Co-Inkubation ebenfalls keine Degranulation.

Die CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 wurden nur durch Stimulation mit PMA/Ionomycin und dem TRP2-positiven Target Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 zur CD107a-Expression angeregt, wobei die Degranulation in Anwesenheit des TRP2-positiven Targets doppelt so hoch ausfiel als durch die unspezifische Stimulation. Nach Co-Inkubation derselben T-Zellen mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen war der Anteil CD107a- und cTCR- $\alpha$ TRP2-exprimierender T-Zellen vergleichbar mit dem nicht-stimulierten CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2.

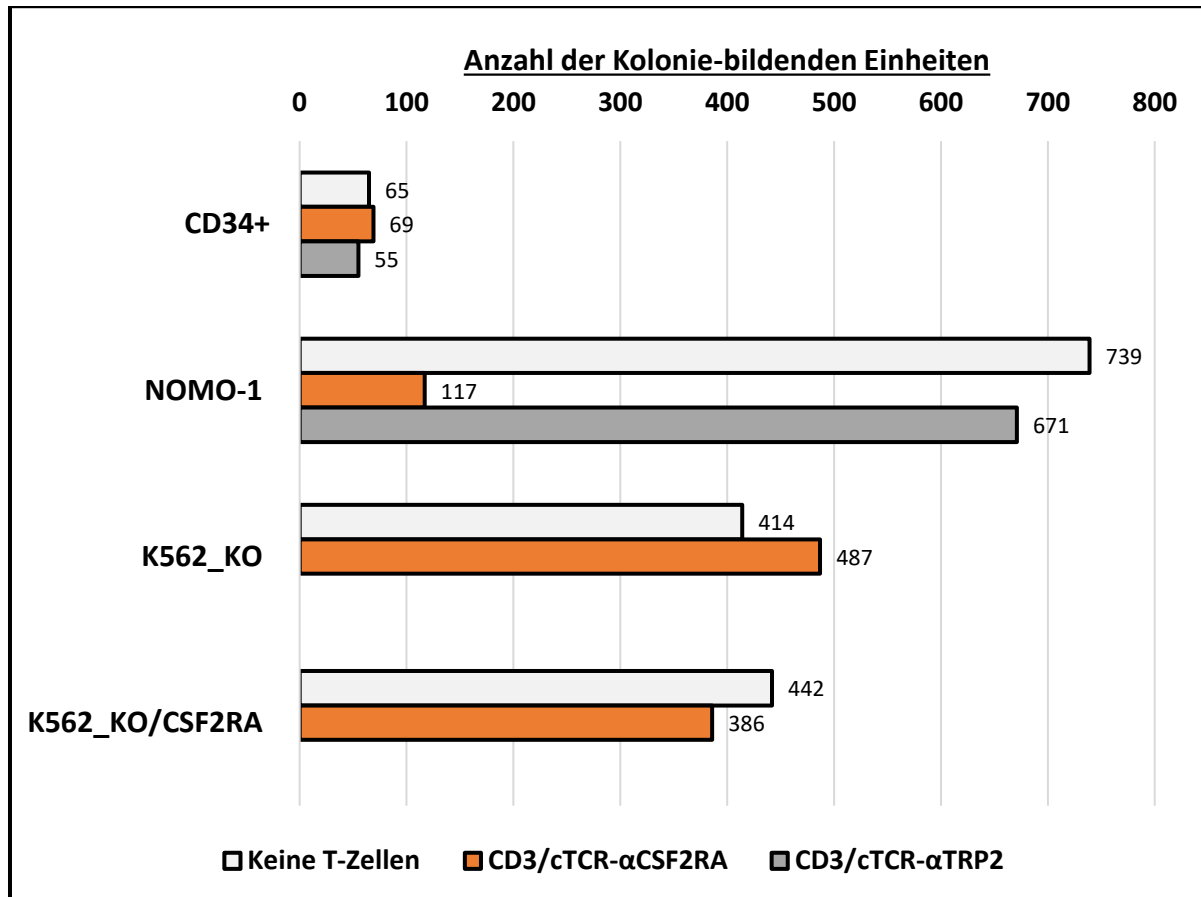


**Abbildung 30: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 3.** Die CD107a-Messungen der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA (orange dargestellt) und der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 (grau dargestellt) nach sechsstündiger Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen und weiteren Targets (linksseitig aufgeführt) erfolgte 12 Tage nach Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Der Nachweis der Ausschüttung lytischer Granula wurde indirekt mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen CD107a durchflusszytometrisch geführt. Die Expression des cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurde bei 62,6 % aller analysierten Zellen nachgewiesen, die des cTCR- $\alpha$ TRP2 bei 77,2 %. Die cTCR-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen mTRAC nachgewiesen. Die dargestellte Prozentzahl bezieht sich auf CD107a- und cTCR-doppelt positive Zellen. Das Effektor: Target-Verhältnis betrug 1:1 bei einer absoluten Zellzahl von jeweils 10<sup>5</sup>. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region

#### 4.4.5 Koloniebildungstest zur Zytotoxizitätsanalyse cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 3 gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen

Der Koloniebildungstest der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen (**Abb. 31**) des Spenders 3 mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen sowie den allogenen Leukämie-Zelllinien NOMO-1, K562\_KO und K562\_KO/CSF2RA resultierte in ähnlichen Ergebnissen, wie sie zuvor schon für die Koloniebildungstests der Spender 1 (**4.2.7**) und 2 (**4.3.5**) gezeigt werden konnten. Eine zu den zuvor untersuchten Spendern vergleichbar starke zytotoxische Wirkung der transgenen CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA konnte gegenüber den endogen CSF2RA-exprimierenden NOMO-1-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch, dass nur wenige der ebenfalls CSF2RA-exprimierenden K562\_KO/CSF2RA Zellen während der Co-Inkubation mit den CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA lysiert worden waren. Darüber hinaus wurde wie auch bei Spender 1 und 2 kein zytotoxischer Effekt der transgenen CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen.

Dem gegenüber steht die geringfügig verringerte Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten der CD34<sup>+</sup> Zellen, die zusammen mit autologen CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 inkubiert worden waren. Verglichen mit den TRP2-negativen, CSF2RA-positiven NOMO-1-Zellen, die nicht über sechs Stunden mit den CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 co-inkubiert worden waren, wiesen die NOMO-1-Zellen nach Inkubation mit den cTCR- $\alpha$ TRP2-positiven T-Zellen eine leicht verringerte Koloniezahl auf.



**Abbildung 31: Koloniebildungstest zur Analyse der Zytotoxizität cTCR-αCSF2RA- oder cTCR-αTRP2-transduzierter T-Zellen des Spenders 3.** Zur direkten Analyse der Zytotoxizität der CD3/cTCR-αCSF2RA (cTCR-Expression 78,11 %) gegenüber autologen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden die transgenen T-Zellen des Spenders 3 12 Tage nach Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA über sechs Stunden mit den autologen CD34<sup>+</sup> Zellen und anderen Targets co-inkubiert und diese anschließend in einem Koloniebildungstest angesetzt. Als Positiv-Kontrollen wurde die zytotoxische Wirkung des cTCR-αCSF2RA gegenüber den CSF2RA-exprimierenden Targets NOMO-1 und K562\_KO analysiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die spezifische Erkennung der CSF2RA-negativen Zelllinie K562\_KO getestet. Zusätzlich wurden zum Vergleich mit der durch den cTCR-αCSF2RA-vermittelten Zytotoxizität auch T-Zellen des Spenders 3, die den irrelevanten cTCR gegen TRP2 exprimierten (cTCR-Expression 63,68 %), auf ihre Zytotoxizität gegenüber TRP2-negativen NOMO-1- und autologen CD34<sup>+</sup> Zellen untersucht. Die Koloniebildenden Einheiten der CD34<sup>+</sup> Zellen wurden nach 14 Tagen gezählt, die der übrigen Targets nach 7. Das Effektor: Target-Verhältnis betrug 1:1, wobei 1000 CD34<sup>+</sup> Zellen und 2000 Zellen der weiteren Targets pro Petrischale eingesetzt wurden. Orangefarbene Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD3/cTCR-αCSF2RA. Graue Balken: Koloniezahl nach Co-Inkubation mit CD3/cTCR-αTRP2.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss des HLA-unabhängigen, CSF2RA-reaktiven T-Zell-Rezeptors auf autologe CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen.

T-Zellen eines autologen und zweier allogener Spender hämatopoetischer Stammzellen wurden retroviral mit dem HLA-Klasse I-unabhängigen, chimärisierten TCR gegen CSF2RA (cTCR- $\alpha$ CSF2RA) transduziert. Die CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen der Spender wurden anschließend zusammen mit den autologen transgenen T-Zellen hinsichtlich cTCR- $\alpha$ CSF2RA-vermittelter Zytotoxizität untersucht. Die transgenen T-Zellen des Spenders 2 wurden zusätzlich nach CD4 und CD8 isoliert und deren Wirkungen separat betrachtet. Als Kontrolle der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-vermittelten Wirkung auf Stamm- und Vorläuferzellen wurde ein Teil der T-Zellen der drei Spender mit einem ebenfalls HLA-Klasse I-unabhängigen cTCR gegen TRP2 ausgestattet und anschließend mit den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen verglichen. Zur Analyse der Zytotoxizität der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-T-Zellen auf die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden Koloniebildungstests eingesetzt. Zur Verifizierung der Funktionalität und der Spezifität der cTCR-transduzierten Effektoren wurden zusätzlich Interferon-gamma-ELISpot-Assays und CD107a-Degranulations-Assays durchgeführt. Die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-vermittelten Effekte wurden zum Vergleich auch gegenüber anderen CSF2RA-positiven Zelllinien getestet. Hierfür wurden die AML-Zelllinie NOMO-1, die CML-Zelllinie K562\_KO/CSF2RA und die Melanomzelllinie Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA verwendet. Als Kontroll-Target wurde darüber hinaus die CML-Zelllinie K562\_KO herangezogen.

Keine der untersuchten cTCR-transgenen T-Zellpopulationen der verschiedenen Spender zeigte eine zytotoxische Wirkung auf autologe CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen in den Koloniebildungstests, wohingegen alle anderen CSF2RA-positiven Targetzellen nicht nur deutlich von cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen T-Zellen in den IFN- $\gamma$ -ELISpots erkannt wurden und diese in den CD107a-Degranulations-Assays zur Sekretion lytischer Granula anregten, sondern auch in den Koloniebildungstests geringere Anzahlen an CFUs ausbildeten. Dies wurde sowohl für cTCR-transgene CD4- als auch CD8-positive T-Zellen nachgewiesen.

### 5.1 Die experimentelle Vorgehensweise in dieser Arbeit

Die Auswahl der Spender erfolgte anhand der vor dem Einfrieren der Apheresatproben gemessenen Menge CD34-positiver Zellen sowie dem Vorhandensein sowohl CD4- als auch CD8-positiver T-Zellen. Alle drei Spender wurden nach einem standardisierten Procedere untersucht. Um die mögliche Zytotoxizität der CSF2RA-cTCR-T-Zellen gegenüber CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests (**3.2.11**) durchgeführt. Als Kontrolle der Funktionalität und Spezifität der CSF2RA-cTCR-T-Zellen dienen IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays (**3.2.8**) und CD107a-Degranulations-Assays (**3.2.10**). Auf diese Weise konnte die T-Zell-Reaktivität einerseits indirekt, also über die Messung der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen und der Analyse der CD107a-Expressionen auf den jeweiligen Zelloberflächen als Indikator für die Sekretion lytischer Granula, untersucht werden. Andererseits hätte eine mögliche, durch CSF2RA-cTCR-T-Zellen vermittelte, zytotoxische Wirkung auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen direkt über die Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten im CFU-Assay nachgewiesen werden können. CFU-Assays sind in der Hämatologie im Bereich der Stammzelltransplantation etabliert, da die CD34<sup>+</sup> Zellen vor einer Transplantation mithilfe dieses Assays auf ihre Funktionalität im Sinne von Proliferation und Differenzierung getestet werden können. Die zusätzlichen CSF2RA-positiven Kontrollzelllinien NOMO-1 und K562\_KO bzw. K562\_KO/CSF2RA wurden nach ihrer Fähigkeit, in dem semi-soliden Medium der CFU-Assays Kolonien zu bilden, ausgewählt.

Der IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay erlaubt eine Aussage über die durch TCR-spezifische Antigenerkennung vermittelte Aktivierung von T-Zellen. Jedoch kann mithilfe dieses Tests nicht direkt auf die Zytotoxizität von T-Zellen geschlossen werden, da IFN- $\gamma$  auch von T-Zellen sezerniert wird, die keine zytotoxische Wirkung aufweisen<sup>32</sup>. Zytotoxische T-Zellen vermitteln

ihre Effektorfunktion unter anderem über die Sekretion von Perforin und Granzym B, die in zytoplasmatischen, lysosomalen Granula gelagert und nach TCR-spezifischer Antigenerkennung mit der Zellmembran fusionieren, sodass lysosomale Membranglykoproteine wie CD107a bei Degranulation durchflusszytometrisch auf der T-Zelloberfläche nachgewiesen werden können<sup>121</sup>. Somit kann der Anteil zytotoxischer T-Zellen mit Hilfe des CD107a-Degranulations-Assays bestimmt werden. Da nicht alle zytotoxischen T-Zellen, die degranulieren, auch IFN- $\gamma$  sezernieren, könnte durch die alleinige Messung der IFN- $\gamma$ -Sekretion der T-Zellen möglicherweise das Ausmaß der zytotoxischen T-Zell-Antwort nicht vollständig abgebildet werden<sup>125</sup>. Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, die zytotoxische Granula enthalten und IFN- $\gamma$  sezernieren, in der Regel auch degranulieren<sup>125</sup>. Der IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay ebenso wie der CD107a-Degranulations-Assay geben anhand der IFN- $\gamma$ -Sekretion und der CD107a-Oberflächenexpression keine Auskunft über das tatsächliche Ausmaß der Lyse spezifisch erkannter Zielzellen. Lyse-Assays wie der Chrom-Freisetzungstest<sup>126</sup> wurden mit den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen als Targetzellen aufgrund ihrer schwierigen Kultivierung und der möglichen Differenzierung aufgrund der Kultivierung nicht durchgeführt. Deshalb wurde die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-vermittelte Zytotoxizität gegenüber CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen nur sicher über die direkt messbare Dezimierung der Kolonie-bildenden Einheiten der zusammen mit T-Zellen co-inkubierten CD34<sup>+</sup> Zellen mithilfe von CFU-Assays analysiert.

## 5.2 Nachweis der CSF2RA-Expression auf hämatopoetischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche durch den CSF2RA-spezifischen, HLA-unabhängigen cTCR- $\alpha$ CSF2RA vermittelte zytotoxische Wirkung auf autologe CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen mittels Koloniebildungstests untersucht. Um die Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zytotoxizität und der CSF2RA-Expression spezifisch erkannter Targetzellen zu untersuchen, sollte vor der Durchführung der jeweiligen Experimente die CSF2RA-Oberflächenexpression der CD34<sup>+</sup> aus dem peripheren Blut gewonnenen Stamm- und Vorläuferzellen und anderer hämatopoetischer Zellen der Spender 1, 2 und 3 mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Dafür wurden die einzelnen in den jeweiligen Leukapheresatproben der Spender vorhandenen Zellpopulationen anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) identifiziert und dann weiter anhand ihrer CD34- und CSF2RA-Expressionsniveaus charakterisiert.

### 5.2.1 Die CSF2RA-Expression reifer Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten

Bereits 1994 bestimmten Wognum et al. mithilfe der Durchflusszytometrie die Expressionsniveaus des GM-CSF-Rezeptors auf reifen und unreifen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks und des Blutes über die Bindung des Biotin-gekoppelten löslichen Liganden GM-CSF an GM-CSF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche<sup>5</sup>. Aus Leukapheresatproben wurden Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten hinsichtlich der Expression des GM-CSF-Rezeptors untersucht, wobei lediglich Monozyten und Granulozyten den Rezeptor nachweislich auf der Zelloberfläche exprimierten. Die durchflusszytometrische Analyse der Monozyten und Granulozyten aus dem peripheren Blut des Spenders 1 wies eine deutliche CSF2RA-Expression auf der Zelloberfläche beider Zellreihen nach (**4.2.1**). Gleiches gilt für die Monozyten und Granulozyten der beiden übrigen Spender (Daten Spender 2 und 3 nicht gezeigt). Somit wurde CSF2RA als Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors zweifelsfrei auf Monozyten und Granulozyten aller drei untersuchten Spender nachgewiesen und die hier erhobenen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.

Dieses Ergebnis wird darüber hinaus insofern von der bestehenden Literatur gestützt, als GM-CSF vor allem als stimulierendes Zytokin für reife Monozyten und Granulozyten sowie deren Vorläuferzellen beschrieben wird<sup>60</sup>. Weiterhin zeigten die Monozyten aller drei untersuchten Spender eine deutlich stärkere CSF2RA-Expression als die zugehörigen Granulozyten. Auch dieses Ergebnis, ebenso wie die nicht nachweisbare CSF2RA-Expression auf Lymphozyten, deckt sich mit publizierten Expressionsanalysen anderer Studien<sup>5,71</sup>.



### 5.2.2 Die CSF2RA-Expression CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Ebenfalls laut Wognum et al. ließen sich hinsichtlich GM-CSF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen drei Populationen unterscheiden<sup>5</sup>. Diejenige Population, die den GM-CSF-Rezeptor am stärksten exprimiert, zeigte die geringste Proliferationsrate und differenzierte nach dreitägiger GM-CSF-Stimulation zu Monozyten. Die Morphologie der beiden verbliebenen Populationen mit mittlerer und nicht nachweisbarer GM-CSF-Rezeptor-Expression ließ laut Autoren auf unreifere hämatopoetische Zellen schließen. Die Stimulation der Zellen mit mittlerer Rezeptor-Expression durch GM-CSF resultierte in einer hohen Proliferationsrate der Zellen und der Differenzierung zu Monozyten- und Granulozytenvorläuferzellen. Doch überraschenderweise proliferierten selbst die CD34<sup>+</sup> Zellen ohne nachweisbare GM-CSF-Rezeptor-Expression nach ausschließlicher Stimulation mit GM-CSF. Die letztere Subpopulation differenzierte zu frühen erythroiden und myeloischen Vorläuferzellen und schien damit die am wenigsten differenzierte Subpopulation darzustellen. Dass der GM-CSF-Rezeptor bereits von den frühesten Vorläufern der Hämatopoese exprimiert wird, konnten Wognum et al. zusätzlich in weiteren FACS-Analysen nachweisen, indem sie zeigten, dass eine kleine Population der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark von Rhesusaffen, die den GM-CSF-Rezeptor exprimierten, RhLA (Rhesus Affen Leukozyten Antigen)-DR-negativ waren<sup>5</sup>. Eine fehlende HLA-DR-Expression ist auch beim Menschen assoziiert mit unreifen, multipotenten hämatopoetischen Zellen<sup>127</sup>. Ob es sich dabei jedoch um hämatopoetische Stammzellen oder multipotente Vorläuferzellen handelte, ist unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, mittels Durchflusszytometrie die Expression der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors, CSF2RA, auf der Oberfläche CD34-positiver hämatopoetischer Zellen nachzuweisen (**4.2.1**). Dennoch zeigten die CD34<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der durchgeführten Koloniebildungstests (**4.2.7, 4.3.5, 4.4.5**) durchaus eine starke Proliferationsfähigkeit sowie die Fähigkeit der Differenzierung zu reiferen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Zellen dennoch CSF2RA exprimieren, welches für die Bildung des für Proliferation und Differenzierung Signalübertragenden Dodecamer-Komplexes des GM-CSF-Rezeptors essenziell ist<sup>50</sup>. Neben GM-CSF enthielt das verwendete Methylcellulose-Medium auch andere Zytokine wie SCF (engl. *human stem cell factor*) und IL-3. Jedoch zeigten frühere Studien, dass scheinbar GM-CSF-Rezeptor-negative, CD34-positive Zellen bei ausschließlicher Stimulation mit GM-CSF zur Proliferation angeregt werden können<sup>5,128</sup>. Dies lässt die Vermutung zu, dass die untersuchten CD34<sup>+</sup> Zellen durchaus, wenn auch in geringem Maße, den GM-CSF-Rezeptor und damit auch CSF2RA trugen.

Eine mögliche Erklärung für die mittels Durchflusszytometrie nicht nachweisbare CSF2RA-Expression besteht darin, dass das CSF2RA-Expressionsniveau der CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen zu niedrig ist, um CSF2RA mithilfe dieses Verfahrens auf ihrer Zelloberfläche zu detektieren. Wognum et al. konnten bereits drei Populationen anhand ihrer CSF2RA-Expression unterscheiden, doch auch mithilfe ihres Verfahrens war es nicht möglich, den nur sehr niedrig exprimierten GM-CSF-Rezeptors nachzuweisen. Da hämatopoetische *Zellen in vivo* durchgehend unter dem Einfluss von GM-CSF stehen, ist es denkbar, dass die Expression des GM-CSF-Rezeptors und folglich auch von CSF2RA herunterreguliert sind<sup>129</sup>. Da CD34<sup>+</sup> Zellen natürlicherweise bereits eine niedrigere GM-CSF-Rezeptor-Expression aufweisen als Monozyten und Granulozyten, widerspricht die detektierbare CSF2RA-Expression auf diesen reifen myeloischen Zellen dieser Erklärung nicht<sup>5</sup>. Weiterhin könnte die Affinität des verwandten Antikörpers nicht ausreichend hoch sein, um an die gegebenenfalls nur in sehr niedriger Anzahl vorkommenden Zielmoleküle zu binden<sup>130,131</sup> und diese so spezifisch nachzuweisen.

Eine weitere Ursache für die nicht nachweisbare CSF2RA-Expression könnte darin begründet liegen, dass die erst unmittelbar vor der FACS-Analyse aufgetauten CD34<sup>+</sup> Zellen CSF2RA tatsächlich nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, da die Kryokonservierung von

Zellproben zu einer Herunterregulierung der Expression der Oberflächenmarker führen kann<sup>132–134</sup>. Möglicherweise hätte eine Kultivierung der mit CD34<sup>+</sup> Zellen angereicherten Leukapheresatproben über einen bestimmten Zeitraum in einem für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen optimalen Medium zur Hochregulation des GM-CSF-Rezeptors und somit auch von CSF2RA geführt. Jedoch stand zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieses Spezialmedium nicht zur Verfügung, sodass man den hämatopoetischen Stammzellen nicht auch nur durch eine kurze Kultivierungsphase eine beginnende Differenzierung ermöglichen wollte.

### 5.3 Die Analyse der zytotoxischen Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 1 auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen

Die mögliche zytotoxische Wirkung des cTCR- $\alpha$ CSF2RA auf die autologen CD34<sup>+</sup> Zellen des Spenders 1 wurde betrachtet, ohne zwischen der Wirkung der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu unterscheiden. Die cTCR-transgenen T-Zellen aus Leukapheresatproben wurden in simultan durchgeführten IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, CD107a-Degranulations-Assays und Koloniebildungstests eingesetzt. Die CSF2RA-exprimierenden Targets NOMO-1, K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA wurden im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay von den CSF2RA-cTCR-T-Zellen deutlich erkannt, während die K562\_KO sowie die autologen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen keine Antigen-vermittelte Aktivierung der T-Zellen induzierten (**4.2.5**). Diese Ergebnisse wurden durch den simultan durchgeführten CD107a-Degranulations-Assay weiter untermauert (**4.2.6**), denn in Gegenwart der Zelllinien NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA wurde eine verstärkte CD107a-Expression auf der Zelloberfläche der CSF2RA-cTCR-T-Zellen nachgewiesen. Auch die nicht CSF2RA-transduzierte Zelllinie K562\_KO regte die transgenen T-Zellen zur Sekretion lytischer Granula an, wenn auch in deutlich geringerem Maß als K562\_KO/CSF2RA. Diese Beobachtung widerspricht nicht zwingend der fehlenden Erkennung im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, da Studien gezeigt haben, dass nicht alle degranulierenden Zellen zusätzlich auch IFN- $\gamma$  sezernieren<sup>125</sup>. Dieses Ergebnis des CD107a-Degranulations-Assays führte zu der Annahme, dass auch die nicht transduzierten K562\_KO-Zellen geringe Mengen CSF2RA auf ihrer Oberfläche exprimieren. Eine zu geringe Sensitivität des in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpers (**3.1.7**) könnte die nicht nachzuweisende CSF2RA-Expression erklären (**4.2.1**). Der myeloische Ursprung dieser Leukämie-Zelllinie würde eine CSF2RA-Expression durchaus wahrscheinlich machen. Diese Frage könnte mittels künftiger Experimente beantwortet werden, indem die CSF2RA-Expression dieser Zellen beispielsweise auf mRNA-Ebene bzw. durch Western-Blotting untersucht würde. Weiterhin ist es möglich, dass die CSF2RA-Expression durch die Zelldichte und damit durch die Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden. Da die getesteten K562\_KO-Zellen aufgrund von biallelischen Knockouts der für CIITA- und  $\beta$ 2M-kodierenden Gene kein HLA-Klasse I und II auf ihrer Oberfläche trugen, kann nicht von einer Aktivierung der transgenen T-Zellen durch eine HLA-abhängige Erkennung der endogen exprimierten TCRs im Sinne einer Allo-HLA-restringierten Kreuzreaktivität ausgegangen werden. Jedoch könnte die beobachtete T-Zell-Aktivierung einerseits durch einen weiteren HLA-unabhängigen, in den Spender-T-Zellen endogen exprimierten TCR oder durch Kreuzerkennung eines unbekanntes Antigens durch den rekombinanten cTCR- $\alpha$ CSF2RA vermittelt werden. Ersteres kann aufgrund der Seltenheit von HLA-unabhängigen TCRs innerhalb des TCR-Repertoires eines erwachsenen Menschen wohl eher ausgeschlossen werden (**2.3.3**). Eine weitere mögliche Erklärung für die nachweisliche Degranulation der CSF2RA-cTCR-T-Zellen nach Co-Inkubation mit den K562\_KO könnte das Vorkommen von iNKT-Zellen (**2.3.2**) innerhalb der untersuchten transgenen T-Zell-Population des Spenders 1 sein iNKT-Zellen als unkonventionelle T-Zellen exprimieren wie auch konventionelle T-Zellen CD3 auf ihrer Zelloberfläche. Charakteristisch für diese Zellen ist die Erkennung von Lipid-Antigenen, die über CD1d, ein  $\beta$ 2M-assoziertes MHC-Klasse I-ähnliches Molekül, präsentiert werden<sup>40</sup>. Zwar exprimieren die K562\_KO-Zellen aufgrund des Knockouts

nicht mehr  $\beta$ 2M, jedoch konnte in einer Studie gezeigt werden, dass iNKT-Zellen die CD1d-negative Leukämie-Zelllinie K562 CD1d-unabhängig erkannten<sup>135</sup>. Außerdem können iNKT-Zellen auch TCR-unabhängig über NK-Rezeptoren wie NKG2D reagieren. Zu beachten ist jedoch, dass diese Zellen in der Regel nur eine kleine Population darstellen (**2.3.2**). Die Auswertung des Koloniebildungstests (**4.2.7**) zeigte, dass die Co-Inkubation mit den CSF2RA-cTCR-T-Zellen keinen zytotoxischen Effekt auf die Kolonie-bildenden Einheiten der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hatte. Die Funktionalität der CSF2RA-cTCR-T-Zellen wurde jedoch durch die eindruckliche Reduktion der Koloniezahlen der CSF2RA-positiven NOMO-1 sowie der K562\_KO/CSF2RA bewiesen. Damit sind die Ergebnisse des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, des CD107a-Degranulations-Assay und des CFU-Assays mit den CSF2RA-cTCR-T-Zellen hinsichtlich der Erkennung gegenüber CD34<sup>+</sup> Zellen und den Kontroll-Targets insgesamt kongruent.

#### 5.4 Die gesonderte Analyse der zytotoxischen Wirkung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen des Spenders 2 auf autologe CD34<sup>+</sup> Zellen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind allgemein als T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) oder regulatorische T-Zellen (Tregs) bekannt, die die Immunantwort über ihren Einfluss auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems sowohl verstärken als auch unterdrücken können. CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen zeichnen sich durch ihre zytotoxischen Eigenschaften innerhalb der Immunantwort gegenüber Pathogenen oder malignen Zellen aus und werden deshalb als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet<sup>32</sup>. Ihre zytotoxische Wirkung beruht unter anderem auf der Mobilisierung lytischer, Perforin- und Granzyme-enthaltender Granula an die Zelloberfläche. Dieser Vorgang wird als Degranulation bezeichnet<sup>125</sup>. Doch innerhalb der letzten Jahre wurde mehrfach über CD4<sup>+</sup> T-Zellen berichtet, die eine direkt zytotoxische Wirkung auf virusinfizierte, aber auch maligne Zellen erzielten<sup>136,137,138</sup>. Während zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD4 CTL) lange Zeit als Artefakt der *in vitro* Zellkultur ohne physiologische Funktion angesehen wurden, belegten verschiedene Studien, dass diese Zellen in geringer Zahl im Blut gesunder Menschen und vermehrt bei Spendern mit viralen Infektionen wie HIV, CMV und EBV nachweisbar sind<sup>136</sup>. Ähnlich wie CD8 CTLs besitzen sie die Fähigkeit, Targets via Fas-Fas-Ligand-Interaktion oder durch Degranulation Perforin- und Granzym-B-vermittelt zu zerstören, wobei letzterer Mechanismus deutlich öfter zu beobachten und durch IL-2-Stimulation induzierbar ist<sup>138,139</sup>. CD4 CTL zeigten wie nicht-zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine MCH-Klasse II-restringierte Antigen-Erkennung<sup>140</sup>. Während zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen zunächst als Unterform von Th1-Zellen eingestuft wurden<sup>139</sup>, wird mittlerweile davon ausgegangen, dass sie eine eigene Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen darstellen<sup>138,141</sup>. Dabei befinden sich differenzierte CD4-T-Zellen nicht in einem statischen Entwicklungszustand, sondern reagieren sensitiv auf extrinsische Signale. Sie besitzen die Fähigkeit zur Transdifferenzierung, was bedeutet, dass sie in Abhängigkeit von dem umgebenden Zytokinmilieu ihre Effektorfunktion verändern können. Dieses Phänomen wird auch als Plastizität bezeichnet<sup>142</sup>. Als Marker der CD4 CTL wurde CRTAM (engl. *Class I-Restricted T cell-Associated Molecule*) identifiziert, der ursprünglich einen Marker für aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen darstellte und an CADM1 (engl. *Cell Adhesion Molecule 1*) bindet. Diese Bindung ermöglicht Interaktionen mit verschiedenen Zellarten. Beispielsweise ist die Bindung der CRTAM- und CD8-positiven T-Zellen an CADM1-exprimierende DC entscheidend für die Proliferation und Akkumulation antigen-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen in Lymphknoten<sup>143</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht nur die Fähigkeit der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2 zur Degranulation, sondern auch deren zytotoxische Wirkung auf Zielzellen bestätigt. CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden durch Inkubation mit der CSF2RA-exprimierenden AML-Zelllinie NOMO-1 zur Sekretion lytischer Granula angeregt (**4.3.4**) und dezimierten eindrucklich die Anzahl gebildeter Leukämiekolonien der NOMO-1-Zellen im Koloniebildungstest dezimieren (**4.3.5**). CD4-positiv T-Zellen besitzen neben lytischen

Eigenschaften die Fähigkeit, Tumorzellen in den Zustand der Seneszenz zu versetzen<sup>144</sup>. Dies wäre eine mögliche alternative Erklärung für die Reduktion der CFUs. Verglichen mit den CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA war die zytotoxische Wirkung der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA allerdings weniger stark ausgeprägt. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen einer erheblich stärkeren Zytotoxizität CD8-positiver T-Zellen überein<sup>138,139</sup>. Bereits in einer diesem Projekt vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass CD8 als Co-Rezeptor für den HLA-Klasse I-unabhängigen TCR gegen CSF2RA, der im Melanommodell Ma-Mel-86b bislang nur bei CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gefunden wurde, für die CSF2RA-Erkennung auf der Targetoberfläche nicht essenziell ist<sup>6</sup>. Dieses Ergebnis wurde somit innerhalb dieser Arbeit bestätigt.

Um die Wirkungen der cTCR-transgenen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzierter beurteilen zu können, wurden bei Spender 2 diese beiden T-Zell-Populationen nach der retroviralen Transduktion der T-Zellen mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA (**4.3.1**) nach den Oberflächenmarkern CD4 und CD8 isoliert (**3.2.4**). Anschließend wurden die CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, einem CD107a-Degranulations-Assay und einem Koloniebildungstest getrennt voneinander untersucht. Im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay wurde eine deutlich messbare Aktivierung sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesen (**4.3.3**). Entsprechend wurde auch eine gesteigerte CD107a-Oberflächenexpression im Zuge des CD107a-Degranulations-Assays und damit eine zytotoxische Wirkung der autologen T-Zellen/cTCR- $\alpha$ CSF2RA auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Koloniebildungstest erwartet. Entgegen den Erwartungen wurden jedoch weder die CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA noch die CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA durch Co-Inkubation mit CD34<sup>+</sup> Zellen zur Sekretion lytischer Granula angeregt (**4.3.4**) und zeigten keinen negativen Einfluss auf die Proliferation der Kolonie-bildenden Einheiten im Koloniebildungstest (**4.3.5**). Im Gegensatz dazu korrelierte bei den übrigen CSF2RA-exprimierenden Targets eine hohe IFN- $\gamma$ -Freisetzung der Effektoren mit einem hohen Anteil degranulierender cTCR-exprimierender T-Zellen sowie mit einer Dezimierung der Anzahl gebildeter Kolonien in den Koloniebildungstests. Das Ergebnis des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA und der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2 wirft einerseits die Frage auf, warum die CSF2RA-cTCR-T-Zellen CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zwar erkennen, obwohl durchflusszytometrisch keine CSF2RA-Expression auf deren Oberfläche nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt, vgl. **4.2.1**). Andererseits stellt sich die Frage, warum T-Zellen, die offensichtlich spezifisch durch die Anwesenheit CD34<sup>+</sup> Zellen aktiviert werden und INF- $\gamma$  sezernieren (**4.3.3**), dennoch nicht degranulieren (**4.3.4**) und keine zytotoxische Wirkung gegenüber den autologen CD34<sup>+</sup> Zellen entfalten (**4.3.5**).

Bei den transgenen T-Zellen aller 3 untersuchten Spender, die retroviral mit dem HLA-Klasse I-unabhängigen cTCR gegen CSF2RA transduziert wurden, wurde jedoch kein Knockout der endogenen T-Zell-Rezeptoren vorgenommen, sodass diese noch immer auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert wurden und für eine cTCR- $\alpha$ CSF2RA-unabhängige Targeterkennung hätten verantwortlich gewesen sein können. Da die cTCR-T-Zellen und die CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen dem gleichen Spender entstammen, ist die Erkennung der autologen Targets folglich nicht durch Alloreaktivität erklärbar<sup>32</sup>. Um genauer beurteilen zu können, ob die T-Zell-Aktivierung oder die zytotoxischen Wirkungen mit der Expression des cTCR- $\alpha$ CSF2RA korrelierten, wurden parallel zur cTCR- $\alpha$ CSF2RA-Transduktion separat autologe T-Zellen retroviral mit einem HLA-unabhängigen, gegen TRP2 gerichteten TCR transduziert. Das Antigen wird exklusiv in Melanozyten exprimiert und der TCR zeigte bisher keine Anzeichen für Kreuzreaktivität. Weder die CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 noch die CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 wurden durch autologe CD34<sup>+</sup> Zellen zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt, weshalb die IFN- $\gamma$ -Sekretion der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen wahrscheinlich auf den cTCR- $\alpha$ CSF2RA zurückzuführen war. Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte bei keinem der drei untersuchten Spender eine CSF2RA-Expression auf der Oberfläche CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesen werden (**4.2.1**). Dennoch ist es

wahrscheinlich, dass diese Zellen CSF2RA exprimierten. Die CSF2RA-Expression könnte aufgrund einer sehr geringen Moleküldichte auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie nicht detektierbar gewesen sein. Aufgrund der möglicherweise höheren Affinität der cTCR gegen CSF2RA, im Vergleich zu den anti-CSF2RA-Antikörpern, könnten die transgenen T-Zellen die hämatopoetischen Zellen trotz ihrer schwachen CSF2RA-Expression spezifisch erkannt haben<sup>130,5</sup>. Hämatopoetische Stammzellen benötigen zur Differenzierung in die myeloische Reihe GM-CSF<sup>5</sup>, welches in dem verwendeten Methylzellulosemedium enthalten war. Da Kolonien myeloischer Vorläuferzellen identifiziert werden konnten (**4.2.7**), kann auf eine Expression des GM-CSF-Rezeptors rückgeschlossen werden.

Während CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen IFN- $\gamma$  sezernieren können ohne zu degranulieren und auf maligne oder Pathogen-befallene Zellen einen direkten zytotoxischen Effekt auszuüben<sup>142</sup>, existieren in der Literatur kaum Berichte über CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die die Eigenschaft besitzen, IFN- $\gamma$  auszuschütten, ohne gleichzeitig auch lytisch zu sein<sup>140</sup>. Anhand der Ansätze mit den anderen Effektor- und Target-Kombinationen wurde beobachtet, dass eine IFN- $\gamma$ -Sekretion der cTCR-transgenen T-Zellen mit der Sekretion ihrer lytischen Granula, einer reduzierten Anzahl gebildeter Kolonien der Targets im CFU-Assay und somit mit einer zytotoxischen Wirkung einhergingen (**4.3.5**). Vergleicht man jedoch die Abbildungen der Ansätze des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays, in denen die CSF2RA-cTCR-T-Zellen des Spenders 2 mit den CSF2RA-exprimierenden Targets NOMO-1, K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA, inkubiert wurden, mit denen, die autologe CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen enthielten, war die unterschiedlich starke Ausprägung der T-Zell-Aktivierung eindrücklicher als im resultierenden Balkendiagramm. Für die Auswertung des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays wurde die maximal zählbare Spotanzahl auf 1000 festgelegt (**3.2.8**). War die IFN- $\gamma$ -Sekretion infolge T-Zell-Aktivierung also sehr ausgeprägt, zeigte sich das in einer Konfluenz der Spots, sodass einzelne Spots auf der Membran des jeweiligen Wells nicht mehr voneinander abgegrenzt wurden, wodurch die Bestimmung der exakten IFN- $\gamma$ -Spot-Anzahl nicht mehr möglich war. Die sehr stark T-Zell-aktivierenden Targets NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA wurden, wenn auch im Fall der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA in schwächerer Ausprägung als durch die CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA, zu Teilen lysiert (**4.3.5**). Nicht lysiert wurden hingegen die autologen CD34<sup>+</sup> Zellen, die die jeweiligen CSF2RA-cTCR-T-Zellen nur in geringerem Maße aktivierten (**4.3.3**). Die mittels Durchflusszytometrie bestimmte CSF2RA-Expression der Zelllinie NOMO-1 war zum Zeitpunkt dieses Experiments höher als die der K562\_KO/CSF2RA (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig war die zytotoxische Wirkung der CSF2RA-cTCR-T-Zellen auf NOMO-1 auch stärker ausgeprägt als auf K562\_KO/CSF2RA. Eventuell müssen also für Zytokinfreisetzung und Lyse unterschiedliche Aktivierungslevel erreicht werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene Ausprägungen der T-Zell-Antworten auf eine unterschiedliche Antigendichte zurückgeführt werden können, was durchaus auch in bereits bestehender Literatur beschrieben ist<sup>82</sup>. In vorangegangenen Projekten wurde die Erkennung von Zellen, die den gesamten GM-CSF-Rezeptor exprimieren, lediglich in ELISpots untersucht<sup>6</sup>. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Zytokinausschüttung und der Degranulation der T-Zellen hinsichtlich der Lyse der CD34<sup>+</sup> Zellen weniger korrelieren als bei Zellen, die lediglich monomeres CSF2RA exprimieren. Möglicherweise zeigen die Koloniebildungstests, dass die gegen CSF2RA-gerichteten T-Zellen hämatopoetische Zellen, die den vollständigen GM-CSF-Rezeptor-Komplex exprimieren, nicht lysieren können, insbesondere in Gegenwart von GM-CSF, welches von einer Vielzahl an Immunzellen sezerniert wird, auch von aktivierten T-Zellen (**2.4.3**).

Eventuell könnten aber auch bisher unbekannte Mechanismen, die die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vor einer zytotoxischen T-Zell-Wirkung schützen und von den CD34<sup>+</sup> Zellen selbst vermittelt wurden, existieren. Beispielsweise könnten sie immunsupprimierende Rezeptoren beziehungsweise Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren oder ähnlich wie mesenchymale Stammzellen lösliche Faktoren sezernieren, die die T-Zell-Antwort inhibieren<sup>145</sup>. Denkbar wäre auch, dass hämatopoetische Stamm- und

Vorläuferzellen von bestimmten, sie umgebenden T-Zellen vor den zytotoxischen T-Zellen geschützt werden. Dieser Mechanismus wurde bereits bei CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen entdeckt, die dendritische Zellen vor einer CTL-vermittelten Tötung schützen konnten, indem sie in den dendritischen Zellen die Expression des endogenen Granzym B-Inhibitors PI-9 hochregulieren<sup>146</sup>. Ein ähnlicher Mechanismus zum Schutz der CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen wäre also durchaus denkbar.

## 5.5 Die Analyse der zytotoxischen Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 3 im Koloniebildungstest

Wie auch bei den Spendern 1 und 2 hatten die CSF2RA-cTCR-T-Zellen des Spenders 3 keinen negativen Einfluss auf die Koloniebildung der CD34<sup>+</sup> Zellen. Auffällig war jedoch, dass die transgenen T-Zellen ebenso gegen die Zellen der CSF2RA-exprimierenden Zelllinie K562\_KO/CSF2RA kaum eine zytotoxische Wirkung entfalteten.

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass die CD107a-Expression auf der T-Zell-Oberfläche mit ihrer zytotoxischen Aktivität korreliert<sup>147,125</sup>. Im Falle der Analysen der Spender 1 und 2 wiesen die Targets, die eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion im ELISpot-Assay (**4.2.5, 4.3.3**) sowie eine Degranulation der cTCR-transgenen T-Zellen auslösten (**4.2.6, 4.3.4**), nach Co-Inkubation mit den jeweiligen Effektoren eine deutlich reduzierte Anzahl an Kolonien in den CFU-Assays auf, verglichen mit denjenigen Targets, die keine T-Zell-Aktivierung und -Degranulation erzielten. Damit stimmten die Ergebnisse der Koloniebildungstests des Spenders 1 (**4.2.7**) und 2 (**4.3.5**) mit den Ergebnissen der IFN- $\gamma$ -ELISpot- und CD107a-Degranulations-Assays überein. Ähnlich zu den Spendern 1 und 2 wurden auch die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 3 durch K562\_KO/CSF2RA deutlich zur IFN- $\gamma$ -Sekretion (**4.4.3**) und Degranulation (**4.4.4**) angeregt. Allerdings war im darauffolgenden CFU-Assay nicht die erwartete, ausgeprägte zytotoxische Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen auf die CML-Zelllinie K562\_KO/CSF2RA nachweisbar. Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde durch die Co-Inkubation mit den Effektoren verglichen mit der Koloniezahl der Targets ohne vorherige Co-Inkubation mit den Effektoren zwar reduziert (**4.4.5**), jedoch fiel die Reduktion schwächer aus als bei den beiden übrigen Spendern (**4.2.7, 4.3.5**).

Unabhängig von dem Ergebnis des CD107a-Degranulations-Assays wäre der fehlende zytotoxische Effekt der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 3 durch einen CSF2RA-Expressionsverlust auf den K562\_KO/CSF2RA erklärbar. Nach dem Ergebnis des Koloniebildungstests des Spenders 3 wurde mittels Durchflusszytometrie eine kaum nachweisbare CSF2RA-Expression der K562\_KO/CSF2RA festgestellt (Daten nicht gezeigt). Der CSF2RA-Verlust könnte beispielsweise aufgrund einer unzureichenden antibiotischen Selektion (**3.2.6.2**) aufgetreten sein. Verglichen mit den cTCR<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 2 zeigten die cTCR<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 3 eine geringere Aktivierung im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay (**4.4.3**). Im CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 3 (**4.4.4**) wurde zwar eine Degranulation durch Co-Inkubation mit K562\_KO/CSF2RA beobachtet, doch verglichen mit dem Anteil CD107a-positiver cTCR<sup>+</sup> T-Zellen der Spender 1 und 2 war dieser bei Spender 3 deutlich geringer. Da die cTCR<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 3 nicht nach den Oberflächenmerkmalen CD4 und CD8 isoliert wurden, könnte das mehrheitliche Vorhandensein CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der cTCR-transgenen T-Zell-Population für die geringe Degranulationsrate verantwortlich gewesen sein, da CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytotoxisch sind und diese Wirkung zum Teil über die Sekretion lytischer Granula entfalten<sup>32</sup>. Allerdings ergab die durchflusszytometrische Subgruppen-Analyse der Leukapheresat-Zellen einen Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen von lediglich 30 % (**4.3.1**). In der gleichen durchflusszytometrischen Messung wurde auch die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-Expression bestimmt, die bei den Leukapheresat-Zellen des Spenders 3 im Vergleich zu den Leukapheresat-Zellen des Spenders 1 (**4.2.2**) und 2 (**4.3.1**) deutlich geringer war. Die Zahl der innerhalb einer Effektor-Target-Kombination eingesetzten Effektoren richtete sich immer nach cTCR<sup>+</sup> Zellen, wodurch die Unterschiede in der cTCR-Expression der verschiedenen Effektorpopulationen ausgeglichen werden sollten. Aber bei

einer gleichzeitig geringen CSF2RA-Expression der K562\_KO/CSF2RA ist dennoch eine Verminderung der cTCR-spezifischen Zytotoxizität denkbar. Als Ursache der nur gering ausgeprägten zytotoxischen Wirkung der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 3 auf die K562\_KO/CSF2RA scheint ein Zusammenspiel der genannten Punkte am wahrscheinlichsten.

## 5.6 Die Alloreaktivität der endogenen T-Zell-Rezeptoren

W6/32 ist ein monoklonaler Antikörper, der an eine gemeinsame Determinante von HLA-Klasse I-Molekülen bindet. Seine Verwendung in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays sollte die HLA-Klasse I-unabhängige Target-Erkennung durch die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden T-Zellen dadurch verifizieren, dass sich die T-Zell-Reaktivität nicht blockieren ließ. Eine Blockade hätte eine MHC-abhängige Reaktivität bedeutet, die auf Allo- oder Kreuzreaktivität der T-Zellen hingewiesen hätte. Eine zusätzliche Kontrolle bzgl. Alloreaktivität wurde durch den Einsatz cTCR- $\alpha$ TRP2-transduzierter T-Zellen erreicht. Durch den Vergleich der beiden unterschiedlichen cTCR-T-Zellen war eine Einschätzung des Anteils an Alloreaktivität möglich. Bei Spender 1 resultierte die Zugabe des HLA-Klasse I-Antikörpers W6/32 in einer geringfügigen Reduktion der IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA bei Co-Inkubation mit den CSF2RA-positiven Zelllinien K562\_KO/CSF2RA und Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA (**4.2.5**). Dies lässt vermuten, dass die Erkennung dieser Targets nicht ausschließlich auf einen HLA-Klasse I-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist. Auch bei Spender 3 wurde die Erkennung CSF2RA-exprimierender Zellen, wie K562\_KO/CSF2RA, durch die CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA durch W6/32 teilweise abgeschwächt (**4.4.3**), ebenso die Erkennung der AML-Zelllinie NOMO-1. Da die CSF2RA-cTCR-T-Zellen der Spender 1, 2 und 3 weiterhin ihre endogenen TCRs exprimierten, hätte die durch W6/32 verminderte Erkennung der drei Zelllinien auf eine Alloreaktivität der getesteten T-Zellen zurückgeführt werden können. Allerdings war im Vorhinein bei der Zelllinie K562\_KO/CSF2RA ein *B2M/CIIITA*-Knockout und bei Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA ein *CIIITA*-Knockout vorgenommen worden (**3.1.11.2, 3.1.11.3**), wodurch sie sowohl für die Expression von HLA-Klasse I- als auch von HLA-Klasse II defizient wurden. Der biallele Knockout der für die Expression von HLA-Klasse I- und II-notwendigen Gene *B2M* und *CIIITA* wurde auf gDNA-Ebene nachgewiesen (Christoph Doppler und Marc Pannenbeckers, persönliche Mitteilung), weshalb eine residuelle HLA-Expression als Begründung für die spezifische Erkennung der Zielzellen nicht plausibel ist. Die Zelllinie NOMO-1 hingegen exprimiert unter anderem HLA-DR<sup>110</sup>, ein HLA-Klasse II-Molekül, sodass die allogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders 3 gegebenenfalls unabhängig von dem transgenen cTCR- $\alpha$ CSF2RA NOMO-1 über ihre endogenen TCRs erkennen konnten. Außerdem berichteten mehrere Publikationen, dass menschliche CD8<sup>+</sup> T-Zellen existieren, die über MHC-Klasse II-präsentierte Moleküle erkennen, sowie umgekehrt auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen entdeckt wurden, die einer MHC-Klasse I-Restriktion unterliegen<sup>148,149</sup>. Folglich könnten die HLA-DR exprimierenden, CSF2RA-positiven NOMO-1-Zellen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Spender erkannt worden sein. Die HLA-DR-Expression der NOMO-1 könnte weiterhin eine Erklärung dafür sein, dass diese CSF2RA-positive Target-Zelllinie in den Koloniebildungstests aller drei Spender (**4.2.7, 4.3.5, 4.4.5**) von den cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen T-Zellen stets stärker lysiert wurden als das ebenfalls CSF2RA-positive Target K562\_KO/CSF2RA, welches HLA-Klasse I- und II-defizient ist (**3.1.11.2**). Dadurch wäre es möglich, dass eine zusätzliche zytotoxische Wirkung auf NOMO-1-Zellen durch die endogenen TCRs der Spender vermittelt wurde.

## 5.7 Stimulation der analysierten T-Zellen mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle für die maximale Degranulationsfähigkeit

Um die Funktionsfähigkeit der CSF2RA-cTCR-T-Zellen auch nach retroviraler Transduktion mit dem cTCR gegen CSF2RA nachweisen zu können und um das Maß der Degranulation der transgenen Effektorzellen gegenüber den verschiedenen Targetzellen besser einordnen zu können, sollte durch die Stimulation der T-Zellen mit PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) /Ionomycin eine möglichst maximale Degranulation der genetisch veränderten T-Zellen

induziert werden<sup>150</sup>. Physiologischerweise wird eine Aktivierung der T-Zellen durch die Interaktion des TCR mit seinem spezifischen Liganden sowie durch ein zweites Signal über co-stimulatorische Moleküle ausgelöst (**2.3.1**). Die Stimulation der T-Zellen mit PMA/Ionomycin ermöglicht jedoch die unspezifische Aktivierung der T-Zellen ohne die Notwendigkeit der Bindung eines TCR-spezifischen Liganden. PMA diffundiert durch die Zellmembran der T-Zellen und ist ein direkter Aktivator der Protein-Kinase C (PKC), während Ionomycin als Calcium-Ionophor, neben der Aktivierung der PKC durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Aktivierung von NFAT beiträgt<sup>32,151</sup>. Folglich bieten die nach PMA/Ionomycin festgestellten Degranulationsraten keinen Anhaltspunkt für die Funktion des eingebrachten cTCRs, sondern vielmehr für die generelle Funktionsfähigkeit der analysierten T-Zellen. Eine Erklärung für die suboptimale Stimulation der T-Zellen durch PMA/I (**4.2.6, 4.3.4, 4.4.4**) könnte eine zu kurze Inkubationszeit sein. Dagegen spricht, dass die Inkubation der T-Zellen mit PMA/I über sechs Stunden als optimaler Zeitraum für eine maximale Degranulation beschrieben wird<sup>151</sup>. Weitere Erklärungen für diese Beobachtung könnten auch sein, dass die eingesetzte Konzentration der beiden unspezifischen Stimulatoren nicht ausreichend war oder die PMA/I-Aliquots durch mehrfaches Auftauen und aufgrund des Alters an Wirkung verloren.

## **5.8 Die Zytotoxizität der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von T-Zellen, die mit einem HLA-unabhängigen, chimärisierten T-Zell-Rezeptors gegen CSF2RA (cTCR- $\alpha$ CSF2RA) transduziert wurden, auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen untersucht werden. Dazu wurden diese zunächst aus den Leukapheresatproben der Spender 1, 2 und 3 extrahiert und somit zur späteren Analyse angereichert. Die Aufreinigung der hämatopoetischen Stammzellen erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (**3.2.5**) über anti-CD34-Antikörper. CD34 repräsentiert einen der ersten Oberflächenmarker, dessen Expression als charakteristisch, jedoch nicht spezifisch für hämatopoetische Stammzellen befunden wurde, und wird bis heute standardmäßig in der Transplantationsmedizin zur Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) aus dem peripheren Blut verwendet<sup>52,61</sup>. Berechnungen zufolge exprimieren mehr als 99% der HSCs CD34, weshalb dieser Marker zur erfolgreichen Anreicherung ausgezeichnet geeignet scheint. Allerdings exprimieren nicht nur hämatopoetische Stammzellen CD34, sondern auch multipotente Progenitorzellen (MPP) sowie andere, stärker differenziertere Vorläuferzellen<sup>52</sup>. Deshalb kann aufgrund der Verwendung von anti-CD34-Antikörpern zur MACS-basierten Isolation von CD34<sup>+</sup> HSC nicht davon ausgegangen werden, dass im Rahmen dieser Arbeit reine Stammzellpopulationen analysiert wurden. Vielmehr kann schlussgefolgert werden, dass die Reaktivität der cTCR-T-Zellen an einer Mischpopulation aus hämatopoetischen Stamm- und schon stärker differenzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht wurde (**2.4.2.1**). Mittlerweile sind neben CD34 weitere, spezifischere Stammzellmarker wie CD90 und CD49f bekannt<sup>58</sup>. Prinzipiell ist es möglich, eine reinere Population hämatopoetischer Stammzellen mithilfe eines dieser Marker oder einer Kombination mehrerer Marker zu isolieren. Doch das Problem der Isolation echter hämatopoetischer Stammzellen besteht darin, dass HSCs sehr selten sind. Nur etwa 0,1 % der Zellen des peripheren Blutes exprimieren CD34. Durch Stimulation mit G-CSF und die daraus resultierende Mobilisation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in das periphere Blut exprimieren bis zu 1% der im peripheren Blut vorhandenen Zellen CD34<sup>69,152</sup>. Unter Berücksichtigung der HSC-spezifischeren Marker CD90 und CD49f sowie der für HSCs obligaten Fähigkeiten zur Regenerierung und einer langfristigen Repopulation des Knochenmarks nach Transplantation liegt die geschätzte Frequenz hämatopoetischer Stammzellen bei mit G-CSF-behandelten Patienten bei etwa 1 von  $6,2 \times 10^6$  mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)<sup>152</sup>. Da die Proben der Spender 1, 2 und 3 in Form von kryokonservierten Zellsuspensionen vorlagen und durch den Auftauprozess mit einer Dezimierung der Zellzahl gerechnet werden musste<sup>153</sup>, lag die erwartete Zellzahl vitaler hämatopoetischer Stammzellen noch darunter. So wäre die



exklusive Analyse der Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen auf autologe hämatopoetische Stammzellen mit einem nicht realisierbaren Probenumfang verbunden und somit im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mehrere Studien demonstrierten, dass das Überleben von Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhielten, positiv mit der Anzahl infundierter CD34<sup>+</sup> Zellen und deren Kolonie-bildender Einheiten (CFU) pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers korrelierte<sup>123</sup>. Da dieses Vorgehen indirekt Rückschlüsse auf die Frequenz hämatopoetischer Stammzellen in Patientenproben erlaubt, wird es deshalb routinemäßig im klinischen Alltag von Transplantationszentren angewandt und ist als standardisiertes Procedere etabliert<sup>61</sup>. Aus diesem Grund wurde die Anreicherung der HSC innerhalb dieser Arbeit ebenfalls anhand des Oberflächenmarkers CD34 vorgenommen. Wegen der unmöglichen Unterscheidung hämatopoetischer Stammzellen von multipotenten Vorläuferzellen innerhalb der analysierten CD34<sup>+</sup> Patientenproben ist die Aussagekraft bezüglich der Zytotoxizität der CSF2RA-cTCR-T-Zellen gegenüber hämatopoetischen Stammzellen eingeschränkt. Die Erkennung des analysierten TCR kann somit nur für die CD34<sup>+</sup> Populationen im Allgemeinen, nicht jedoch explizit für echte HSC ausgeschlossen werden. So könnte es sein, dass aufgrund der Seltenheit der HSC, selbst in mit hämatopoetischen Stammzellen angereicherten Patientenproben, eine zytotoxische Wirkung der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierenden T-Zellen, sollte sie sich ausschließlich auf die HSCs beschränken, möglicherweise in einem CFU-Assay nicht hätte nachgewiesen werden können, da sie zu keiner merklichen Reduktion der Koloniezahl geführt hätte.

Wognum et al. zeigten bereits, dass die Expression des GM-CSF-Rezeptors auf hämatopoetischen Zellen mit fortschreitender Differenzierung zunimmt und die stärkste Expression auf reifen Zellen der myeloischen Reihe, also Granulozyten und Makrophagen, vorzufinden ist<sup>5</sup>. CAR-T-Zellen gegen CSF2RA/CSF2RB-Heterodimere entfalteten die größte zytotoxische Wirkung genau auf diese stark CSF2RA-exprimierenden Monozyten, wohingegen nur schwach CSF2RA-exprimierende myeloische und erythroide Vorläuferzellen weniger effizient lysiert wurden<sup>82</sup>. Im Gegensatz dazu wurden für andere CAR-T-Zellen, die gegen den GM-CSF-Rezeptor gerichtet waren, keine zytotoxischen Effekte auf unreife CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sowie reifere CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> Vorläuferzellen beobachtet<sup>103</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint eine mögliche Zytotoxizität der cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen gegenüber hämatopoetischen Stammzellen eher unwahrscheinlich, da die Proliferation reiferer und offensichtlich stärker GM-CSF-Rezeptor-exprimierender Vorläuferzellen nicht negativ beeinflusst wurde. Letzteres konnte eindeutig bewiesen werden, da die Anzahl der CFUs bei keinem der drei Spender durch Co-Inkubation CD34-positiver Zellen mit cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgenen Effektoren negativ beeinflusst wurde. Die Zytotoxizität gegenüber den einzelnen und verschieden stark differenzierten hämatopoetischen Zellen wurde, wie zuvor schon erwähnt, aufgrund der zum Teil schwierigen Zurordnung zu den einzelnen Zellreihen nicht gesondert betrachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Literaturergebnisse sind somit kongruent zu der Hypothese, dass der cTCR- $\alpha$ CSF2RA monomeres CFS2RA, welches von diversen soliden Tumoren exprimiert wird<sup>2</sup>, deutlich besser erkennt als den gesamten Dodecamer-Komplex des GM-CSF-Rezeptors, der physiologisch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird<sup>6</sup>. Es ist nicht bekannt, ob die Melanompatientin Ma-Mel-86, aus der die CTL gegen CSF2RA ursprünglich isoliert wurden, Anzeichen einer gestörten Hämatopoese gezeigt hatte. Dabei wiesen die CSF2RA-reaktiven CTL eine der höchsten Frequenzen unter den tumorreaktiven CTL im Blut der Patientin auf, wie in vorangegangenen Projekten innerhalb der AG Wölfel gezeigt wurde.

Die Auswertung der Koloniebildungstests der Spender 1 **(4.2.7)**, 2 **(4.3.5)** und 3 **(4.4.5)** zeigte, dass die Co-Inkubation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA bzw. der CD4- oder CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA mit autologen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nicht in einer Reduktion der Zahl Kolonie-bildender Einheiten, die aus differenzierten CD34<sup>+</sup> Zellen gebildet wurden,

resultierte. Es konnte also kein zytotoxischer oder anderweitig inhibitorischer Effekt durch die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen gegenüber CD34<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmte mit den parallel durchgeführten Erkennungstests überein. Dabei bezieht sich diese Beobachtung lediglich auf die Gesamtanzahl der Kolonie-bildenden Einheiten, jedoch nicht auf die Häufigkeiten der unterschiedlichen CFUs. Während der Auszählung der CFUs wurden die Frequenzen der unterschiedlichen Differenzierungsstadien hämatopoetischer Vorläuferzellen also nicht berücksichtigt. Laut Hersteller ermöglicht das Methylcellulose-Medium (**3.1.12**) die Ausbildung von CFU-GEMM (Colony-forming unit granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte), CFU-GM (Colony-forming unit granulocyte, macrophage), BFU-E (burst-forming unit erythroid) und CFU-E (Colony-forming unit erythroid). Unter Berücksichtigung der angewandten Auswertungsstrategie ist die Aussagekraft bezüglich eines möglichen negativen Effektes des cTCR- $\alpha$ CSF2RA auf einzelne CFU-Subgruppen oder BFU nur eingeschränkt möglich, sodass für eine noch differenziertere Aussage die Zählung unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Differenzierungsstufen Kolonie-bildender Einheiten vorgenommen werden müsste. Die Zielsetzung innerhalb dieser Arbeit lag jedoch in der Beurteilung der generellen zytotoxischen Wirkung des cTCRs im Sinne einer Reduktion Kolonie-bildender Einheiten. Nakazawa et al. wiesen nach, dass bei Patienten mit juveniler myelomonozytischer Leukämie (JMML) das Koloniewachstum CD34<sup>+</sup> Leukämiezellen durch einen GM-CSF-basierten CAR gegen den GM-CSF-Rezeptor signifikant reduziert wurde, wohingegen keine negativen Auswirkungen auf CD34<sup>+</sup> Zellen gesunder Spender hinsichtlich ihrer Differenzierung zu myelomonozytischen und erythroiden Vorläufern beobachtet wurden<sup>103</sup>. Eine Studie zu Liganden-basierten CAR-T-Zellen, die gegen den gesamten GM-CSF-Rezeptor, also gegen den Komplex aus CSF2RA (CD116) und CSF2RB (CD131), gerichtet waren und GM-CSF als Antigen-Bindungsstelle beinhalteten, konnte antitumorale Effekte gegen CSF2RA-exprimierende AML-Zellen sowohl in vitro als auch mithilfe von in vivo-Mausmodellen nachweisen. Jedoch zeigten Analysen zu zytotoxischen Effekten der anti-GM-CSFR-CAR-T-Zellen auf nicht-malignen hämatopoetischen Zellen eine starke Zytotoxizität gegenüber Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen und eine nur gering ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber erythroiden Vorläuferzellen<sup>82</sup>. Aufgrund dieser unterschiedlichen Studienergebnisse ist es zur Beurteilung der Sicherheit für die spätere Verwendung des HLA-unabhängigen  $\alpha$ CSF2RA-TCR in T-Zell-basierten Immuntherapien notwendig, eine differenziertere Zytotoxizitätsanalyse bezüglich verschiedener hämatopoetischer Zellen und ihrer Vorläuferzellen durchzuführen. Aufgrund der zum Teil schwierigen Zuordnung der Kolonien zu den verschiedenen Zellreihen hat sich die Analyse der Zytotoxizität auf die absolute Reduktion der gesamten Koloniezahl beschränkt.

## **5.9 Mögliche unerwünschte Nebenwirkungen cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen bei der Anwendung in künftigen Immuntherapien**

Die alpha-Kette des GM-CSF-Rezeptors, CSF2RA, repräsentiert aufgrund ihrer Expression sowohl in diversen soliden Tumorentitäten wie Mammakarzinomen, Kolorektalkarzinomen oder malignen Melanomen, als auch in akuten myeloischen Leukämien (AML) oder der juvenilen myelomonozytischen Leukämie (JMML) ein attraktives Target für antitumorale Therapien verschiedenster Art<sup>2,82,103</sup>. Anti-Tumor-Effekte durch Liganden-basierte CAR-T-Zellen gegen den GM-CSF-Rezeptor konnten bereits für akute myeloische Leukämien in vitro und in vivo in Mausmodellen sowie für die JMML in vitro demonstriert werden<sup>82,103</sup>. Der cTCR- $\alpha$ CSF2RA erkennt CSF2RA auf malignen Melanomen ebenso wie auf verschiedenen Leukämien<sup>6</sup>, weshalb der adoptive Transfer von CSF2RA-cTCR-T-Zellen eine vielversprechende Therapieoption für die Zukunft sein könnte. Vor dem Hintergrund, dass CSF2RA natürlicherweise von Monozyten, Granulozyten, ihren Vorläuferzellen sowie in geringem Maße auch von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird<sup>5</sup>, ist es denkbar, dass als Konsequenz der Applikation von T-Zellen, die den HLA-Klasse-I-unabhängigen T-Zell-Rezeptor gegen CSF2RA tragen, neben einer antitumoralen Wirkung die Zerstörung von

Zellen der myeloischen Reihe oder sogar der gesamten hämatopoetischen Zellen auftreten könnte. Wie oben beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit weder mit CD8<sup>+</sup> noch mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die stabil mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA transduziert waren, *in vitro* zytotoxische Effekte auf autologe CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesen (**4.2.7, 4.3.5, 4.4.5**). Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Studie, die die antitumorale Wirkung von CAR-T-Zellen gegen den GM-CSF-Rezeptor bei JMML-Zellen untersuchte. Diese hatten keinen negativen Einfluss auf die Koloniebildung CD34-positiver Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark<sup>103</sup>. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht die Studie zu CAR-T-Zellen gegen den aus CSF2RA und CSF2RB bestehenden GM-CSF-Rezeptor-Komplex auf AML-Zellen, in welcher mittels Koloniebildungstests zytotoxische Effekte auf Monozyten und dendritische Zellen, aber auch auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen der myeloischen Reihe beschrieben wurden, jedoch nicht gegenüber erythroiden Vorläuferzellen<sup>82</sup>. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass pluripotente Stammzellen nicht geschädigt wurden. In vorangegangenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von GM-CSF die Erkennung von cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen blockierten<sup>6</sup>. Anhand dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierte T-Zellen *in vivo* geringeren Schaden an hämatopoetischen Zellen anrichten würden als die CAR-T-Zellen gegen CSF2RA/CSF2RB. In beiden CAR-T-Zell-Studien konnte eine CSF2RA-Expression auf den untersuchten CD34<sup>+</sup> Zellen zweifelsfrei nachgewiesen werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang.

Um also eine sichere Aussage bezüglich der Sicherheit des cTCR- $\alpha$ CSF2RA gegenüber CD34<sup>+</sup> Zellen treffen zu können, müssten zunächst weitere Versuche zur CSF2RA-Oberflächenexpression der verwendeten CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgen. Möglicherweise könnte die Kultivierung der CD34<sup>+</sup> Zellen über mehrere Tage einer durch den Auftauprozess induzierten Reduktion der CSF2RA-Expression entgegenwirken und die CSF2RA-Expression der Zellen hochregulieren. Obwohl die CD34<sup>+</sup> Zellen durch CSF2RA-cTCR-T-Zellen eindeutig nicht in ihrer Proliferation gehemmt werden, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, lässt sich anhand des Koloniebildungstests nicht sicher ausschließen, dass die seltenen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen durch den cTCR- $\alpha$ CSF2RA geschädigt werden (**2.4.2.1**). Jedoch scheint aufgrund der Ergebnisse eine nachhaltige Schädigung der Hämatopoese unwahrscheinlich. Auch die beiden bereits erwähnten CAR-T-Zell-Studien überprüften die Sicherheit der modifizierten T-Zellen anhand angereicherter CD34<sup>+</sup> Zellen durch Koloniebildungstests. Zum definitiven Ausschluss einer möglichen Zytotoxizität gegenüber hämatopoetischen Stammzellen könnte beispielsweise *in vitro*, vor der Durchführung von Koloniebildungstests, eine Isolation dieser HSCs über Stammzell-spezifischere Marker wie CD49f oder eine Kombination mehrerer Marker erfolgen<sup>58</sup>. Diese Zellen könnten dann als eigenständige Population und im Vergleich zu den isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen analysiert werden, sofern eine ausreichende Zahl echter HSC isoliert werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, die im Anschluss an die Co-Inkubation von cTCR- $\alpha$ CSF2RA<sup>+</sup> T-Zellen und CD34<sup>+</sup> Zellen durchgeführte Transplantation der humanen Stamm- und Vorläuferzellen in NOD/SCID Mäuse, um feststellen zu können, ob alle Zelllinien durch eine uneingeschränkte Hämatopoese rekonstituiert und aufrecht erhalten werden können<sup>52,69</sup>. Da CSF2RA neben hämatopoetischen Zellen auch von Trophoblasten, Endothelzellen und verschiedenen Zellen des Nervensystems exprimiert wird, ist die Evaluation einer unerwünschten Zytotoxizität gegenüber diesen Zellen *in vitro* und *in vivo* in der Zukunft ebenfalls notwendig<sup>68,73,67</sup>.

Da dieser Arbeit vorangegangene Experimente zur Sicherheit cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierter T-Zellen die spezifische Erkennung von Monozyten, dendritischen Zellen und Granulozyten im Interferon- $\gamma$ -ELISpot zeigten<sup>6</sup>, müssten mögliche zytotoxische Wirkungen auf reife hämatopoetische Zellen genauer, zunächst *in vitro* und anschließend *in vivo*, evaluiert werden. Sollten mit dem cTCR- $\alpha$ CSF2RA transduzierte T-Zellen reife myeloische Zellen wie Monozyten und Granulozyten oder deren Vorläuferzellen erkennen und zerstören, wäre eine vorübergehende Monozytopenie oder Granulozytopenie, ähnlich wie nach allogener oder autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation, mithilfe antiviraler, antimykotischer

und antibiotischer Prophylaxe sowie einer möglichst keimarmen Umgebung zu bewältigen<sup>154</sup> und trotz zytotoxischer Wirkung auf hämatopoetische Zellen eine Therapie CSF2RA-exprimierender, nicht hämatologischer Tumoren möglich. Im Hinblick auf T-Zell-basierten Tumorthérapien stellt sich die Frage, ob neben CARs HLA-unabhängige T-Zell-Rezeptoren gleicher Spezifität eine vergleichbar potente Therapieoption darstellen. Mansilla-Soto et al. verglichen die antitumorale Wirkung und die Sensitivität HLA-unabhängiger TCRs gegen CD19 und CD70 mit CARs gleicher Spezifität<sup>155</sup>. Die Ergebnisse zeigten, dass die HLA-unabhängigen TCRs eine mindestens 10-fach höhere Sensitivität gegenüber den Zielantigenen besaßen und somit im Besonderen als Therapie für Tumore mit niedriger Antigendichte geeignet sind. Der Verlust des Zielantigens bzw. dessen verminderte Expression im Krankheitsverlauf ist noch immer maßgeblich für das Therapieversagen bei CAR-T-Zell-Patienten verantwortlich<sup>155</sup>.

Auch bei soliden, CSF2RA-exprimierenden Tumoren könnte der HLA-unabhängige TCR gegen monomeres CSF2RA eine aussichtsreiche Alternative zu gegen den GM-CSF-Rezeptor gerichteten CAR-T-Zellen darstellen. Bisher wurde noch keine CAR-T-Zell-Therapie gegen solide Tumoren zugelassen, da bisherige Studien diesbezüglich eine nur unzureichende Tumorfiltration und Effektivität der CAR-T-Zellen zeigten **(2.5.2.1)**. HLA-unabhängig CSF2RA-reaktive CTL wurde in relativ hoher Frequenz im Blut der Patienten Ma-Mel-86 nachgewiesen und waren auch in tumorfiltrierenden T-Zellen zu finden **(5.8)**. Zudem wird monomeres CSF2RA eher in soliden Tumoren als in hämatologischen Malignomen exprimiert<sup>2</sup>, sodass eine klinische Anwendung von CSF2RA-cTCR-T-Zellen neben hämato-onkologischen Patienten mit JMML oder bestimmten AMLs auch bei Patienten mit soliden Tumoren vielversprechend erscheint. Zusätzlich ist es denkbar, neben einer Therapie mit autologen CSF2RA-reaktiven T-Zellen zukünftig auch eine „Off-the-shelf“-Therapie mit allogenen T-Zellen zu realisieren. Diese Möglichkeit bietet sich aufgrund der CSF2RA-Expression in multiplen Tumorentitäten und des HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus des innerhalb dieser Arbeit untersuchten TCR an. Gentechnische Methoden wie CRISPR/Cas könnten darüber hinaus, wie bereits bei CAR-T-Zellen untersucht wird, eine Alloreaktivität vermindern, indem die endogenen TCRs der allogenen T-Zellen ausgeschaltet werden **(2.5.2.1)**. Zusätzlich könnte mittels Gen-Knockout ein HLA-Verlust erzielt werden, sodass die Immunogenität der allogenen T-Zellen abnimmt **(2.2.2.1)**. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems ist es wahrscheinlich, dass verschiedene Mechanismen zum Verlust der Immunogenität in den künstlich hergestellten T-Zellen kombiniert werden müssten, um der Erkennung und Zerstörung oder zumindest einer Einschränkung der Wirksamkeit zu entkommen. Das wachsende Verständnis von der „Immunflucht“ der Krebszellen bietet Möglichkeiten, dieses Wissen auch in der Zell-Therapie anzuwenden. So könnten allogene Zellen mit immunsuppressiven Molekülen wie PD-L1 oder CTLA-4 ausgestattet werden oder durch Expression von TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) eine immunsuppressive Zytokinumgebung schaffen<sup>156</sup>. Eine Gefahr der für das Immunsystem unsichtbaren allogenen Zellen besteht allerdings darin, dass maligne transformierte Spenderzellen auf Empfänger übertragen werden könnten, ohne dass deren Immunsystem diese erkennen und zerstören könnte<sup>156</sup>.

Würde sich anhand von *in vivo* Experimenten, entgegen der Erwartungen nach den Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit, herausstellen, dass cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transgene T-Zellen eine Destruktion autologer CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stammzellen induzieren, wäre ein adoptiver Zell-Transfer cTCR- $\alpha$ CSF2RA-exprimierender T-Zellen weiterhin als Therapieoption für bestimmte hämatologische Tumoren unter gewissen Bedingungen denkbar. Würde das antitumorale Therapieregime eine Transplantation hämatopoetischer Stammzellen vorsehen, wäre es vorstellbar, die cTCR- $\alpha$ CSF2RA-transduzierten T-Zellen im Rahmen der einer Transplantation vorangehenden Konditionierung einzusetzen. Womöglich wäre sogar durch die zusätzliche Applikation der transgenen T-Zellen eine Reduktion der nebenwirkungsreichen, zur Konditionierung verwandten Chemotherapeutika oder Strahlungsmengen zu erreichen<sup>157</sup>. Eine zytotoxische Wirkung des HLA-Klasse I-

unabhängigen TCR auf hämatopoetische Zellen könnte also unter gewissen Umständen durchaus akzeptiert werden, sofern die Zytotoxizität und der Zustand der Immundefizienz zeitlich begrenzt wären. Um eine verbesserte Einflussnahme auf die Überlebenszeit adoptiv transferierter T-Zellen und mögliche unerwünschte Nebenwirkungen dieser Therapieform sichern zu können, werden aktuell eine Vielzahl von Studien zu verschiedenen Sicherheitsmechanismen durchgeführt, die simultan mit CARs oder modifizierten T-Zell-Rezeptoren in die zu transplantierenden T-Zellen eingebracht werden können. Dazu gehören Selbsttötungsgene (engl. *suicide genes*) wie iCasp9 (engl. *inducible safety switch caspase 9*) oder HVS-tk (Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase) oder co-exprimierte Oberflächenmoleküle wie CD20 oder EGFRt (engl. *truncated epidermal growth factor receptor*). Gegen die Oberflächenmoleküle CD20 und EGFR existieren bereits zugelassene monoklonale Antikörper, Rituximab und Cetuximab, die im Falle unerwünschter Nebenwirkungen auf gesunde hämatopoetische Zellen appliziert werden und die genetisch modifizierten T-Zellen zerstören können<sup>158</sup>. Eine weitere Möglichkeit, CSF2RA-exprimierende hämatopoetische Zellen vor einer unerwünschten Zytotoxizität durch den cTCR- $\alpha$ CSF2RA zu schützen, wäre die Applikation eines monoklonalen Antikörpers, der die Bindung der transgenen T-Zellen an CSF2RA verhindert und im Fall ausgeprägter Komplikationen nach Behandlung mit den transgenen T-Zellen verabreicht werden könnte. Mavrilimumab als monoklonaler Antikörper gegen CSF2RA wird als Therapieoption unter anderem gegen rheumatoide Arthritis und Covid-19 erforscht, da GM-CSF als proinflammatorisches Zytokin zu einer überschießenden Immunreaktion beitragen kann<sup>78,80</sup> **(2.5.1)**. Studienergebnisse zur Sicherheit des monoklonalen Antikörpers bei rheumatoider Arthritis in der Langzeitanwendung über etwa 2,5 Jahre zeigten, dass bei nur 0,9% der Patienten eine Neutropenie auftrat, wohingegen es keine Berichte zum Auftreten einer Monozytopenie gab<sup>80</sup>. Dabei ist hervorzuheben, dass Mavrilimumab ein IgG4-Antikörper ist<sup>77</sup> und somit keine relevanten ADCC-Effekte (engl. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) vermittelt und selbst nicht zellschädigend ist<sup>159</sup>. Es wäre also zu erwarten, dass Mavrilimumab durch die spezifische Bindung an das Targetmolekül CSF2RA cTCR-exprimierenden T-Zellen blockieren kann.

## 6 Zusammenfassung

Die  $\alpha$ -Kette des GM-CSF-Rezeptors, CSF2RA, wurde in vorangegangenen Arbeiten als Zielantigen eines HLA-unabhängigen  $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptors (TCR) aus Blut der Melanompatientin Ma-Mel-86 identifiziert. T-Zellen mit diesem TCR wurden darüber hinaus auch im Tumorgewebe der Patientin gefunden. Der TCR erkennt CSF2RA als intaktes Membranprotein auch in Gegenwart der  $\beta$ -Kette CSF2RB, wird jedoch durch die Zugabe von GM-CSF blockiert. Er wurde zur Vermeidung unerwünschter Paarungen transgener TCR-Ketten mit komplementären endogenen Ketten mit murinen konstanten TCR-Regionen chimärisiert (abgekürzt mit cTCR bezeichnet) und in einem bicistronischen retroviralen Vektor für die vorliegende Arbeit bereitgestellt. Da CSF2RA nicht nur von Melanomen, sondern auch von anderen soliden Tumoren sowie Leukämien exprimiert wird und Tumorzellen über unterschiedliche Mechanismen Wachstumsvorteile verschafft, könnten HLA-unabhängige TCR gegen CSF2RA mit einer großen Anwendungsbreite therapeutisch eingesetzt werden. Damit ließe sich auch die Herabregulation oder der Verlust der HLA-Expression auf Tumoren überwinden, die häufig zu Immunresistenz führen. Da CSF2RA auf reifen sowie auf CD34-positiven Vorläuferzellen der Myelopoese exprimiert wird, besteht jedoch die Gefahr, dass CSF2RA-reaktive T-Zellen eine nachhaltige Schädigung der Knochenmarkfunktion bewirken. Um dieses Risiko besser einschätzen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* der Effekt des gegen CSF2RA gerichteten cTCR auf CD34-positive hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen mit Hilfe eines Koloniebildungstests untersucht (CFU-Assay, engl. Abkürzung für *colony-forming unit assay*).

T-Lymphozyten aus kryokonservierten Leukapheresaten dreier Stammzellspender wurden retroviral mit dem cTCR gegen CSF2RA oder einem irrelevanten HLA-unabhängigen cTCR gegen TRP2 (engl. Abkürzung für *tyrosinase-related protein 2*) transduziert. Zusätzlich wurden

aus den Leukapheresatproben der drei Spender CD34-positive Zielzellen aufgereinigt. Kontrollzielzellen waren HLA-defiziente, CSF2RA-negative und stabil mit CSF2RA transfizierte K562-Zellen, die CSF2RA-positive Leukämiezelllinie NOMO-1 und die CSF2RA-positive Melanomzelllinie Ma-Mel-86b. Die Funktionalität und Spezifität der cTCR-transgenen T-Zellen wurden durch IFN- $\gamma$ -ELISpot- und CD107a-Degranulations-Assays verifiziert. Bei keinem der drei Spender wurden CD34-positive Zellen von autologen T-Zellen gegen CSF2RA erkannt. CD34-positive Leukapheresatzellen wurden nach sechsstündiger Co-Inkubation im Verhältnis 1:1 mit autologen cTCR-transduzierten T-Zellen auf CFU-Assay-Platten ausgesät. Daneben wurden Positiv- und Negativkontrollzellen der gleichen Prozedur unterzogen. Nach ein bis zwei Wochen wurden die Kolonien gezählt. Die Koloniebildung von CD34-positiven Zellen wurde bei keinem der Spender von autologen T-Zellen gegen CSF2RA gehemmt, wogegen die Koloniebildung von CSF2RA-positiven Kontrollzellen durch T-Zellen gegen CSF2RA unterdrückt wurde, nicht aber durch T-Zellen gegen TRP2. Während bei zwei der drei Spender CD3-positive T-Zellen als Effektorpopulationen dienten, wurden die T-Zellen bei einem der Spender nach der retroviralen Transduktion mit dem cTCR nach CD4 und CD8 isoliert und getrennt getestet. Beide Populationen waren funktional, wenngleich CD8-positive gegenüber CD4-positiven Effektoren eine gesteigerte zytolytische Kapazität aufwiesen. Jedoch war auch kein Effekt auf die Koloniebildung CD34-positiver Zellen zu sehen, wenn die Effektorpopulation nur aus CD8-positiven T-Zellen gegen CSF2RA bestand.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, dass transgene T-Zellen, ausgestattet mit dem HLA-unabhängigen TCR gegen CSF2RA, die Koloniebildung autologer CD34-positiver hämatopoetischer Zellen *in vitro* nicht negativ beeinflussen. Diese Ergebnisse unterstützen weiterführende präklinische und klinische Studien zum Einsatz des CSF2RA-spezifischen, HLA-unabhängigen TCR.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Chen, F. Expression and Clinical Value Analysis of CSF2RA in Malignant Tumor Based on Database. *J. Biosci. Med.* **09**, 149–157 (2021).
3. Ding, D. X. H. *et al.* The  $\alpha$  subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2537–2541 (1994).
4. Robertson, S. A., Sjöblom, C., Jasper, M. J., Norman, R. J. & Seamark, R. F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* **64**, 1206–1215 (2001).
5. Wognum, A., Westerman, Y., Visser, T. & Wagemaker, G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34+ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood* **84**, 764–774 (1994).
6. Kukla, K. HLA-unabhängige Antigenerkennung von CSF2RA auf Leukämie- und Melanomzellen durch CD8 + T-Zellen. (Johannes Gutenberg-Universität, 2015).
7. OECD©. Health Status: Causes of mortality. *OECD Health Statistics July 2021*. <https://stats.oecd.org/Index.aspx?QueryId=30115> (2021).
8. World Health Organization. Health topics/Cancer. [https://www.who.int/europe/health-topics/cancer#tab=tab\\_2](https://www.who.int/europe/health-topics/cancer#tab=tab_2) (2021).
9. Statistisches Bundesamt. Krebs war 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich. *Pressemitteilung* Nr. N 010 [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21\\_N010\\_231.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html) (2021).
10. Hesketh, R. The Multistep Nature of Cancer. *Oncogene Tumour Suppressor Gene Factsb.* **9**, 54–60 (1997).
11. Weinberg, R. A. How Cancer Arises. *Sci. Am. Mol. Oncol.* 62–70 (1996).
12. Knudson, A. G. *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. vol. 68 (1971).
13. Hanahan, D., Weinberg, R. A. & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **100**, 57–70 (2000).
14. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 274 (2016) doi:10.17886/RKIPUBL-2016-014.
15. Malaguarnera, L., Cristaldi, E. & Malaguarnera, M. The role of immunity in elderly cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **74**, 40–60 (2010).
16. Fulop, T. *et al.* Potential role of immunosenescence in cancer development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1197**, 158–165 (2010).
17. Chen, D. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
18. Pio, R., Ajona, D., Ortiz-Espinosa, S., Mantovani, A. & Lambris, J. D. Complementing the Cancer-Immunity Cycle. *Front. Immunol.* **0**, 774 (2019).

19. Vesely, M., Kershaw, M., Schreiber, R. & Smyth, M. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
20. Zimmermannova, O., Caiado, I., Ferreira, A. G. & Pereira, C.-F. Cell Fate Reprogramming in the Era of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **12**, 1–22 (2021).
21. Birkeland, S. *et al.* Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964–1986. *Int. J. cancer* **60**, 183–189 (1995).
22. Burnet, M. \* III. VIRUSES ASSOCIATED WITH NEOPLASTIC CONDITIONS. *Br. Med. J.* 841–847 (1957).
23. Mittal, D., Gubin, M., Schreiber, R. & Smyth, M. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16–25 (2014).
24. Bui, J. & Schreiber, R. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 203–208 (2007).
25. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. THE THREE ES OF CANCER IMMUNOEDITING. *Annu. Rev. Immunol* **22**, 329–60 (2004).
26. Schreiber, R., Old, L. J. & Smyth, M. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
27. Chang, C. *et al.* Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **162**, 1229–1241 (2015).
28. Battle, E. & Massagué, J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
29. Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18–32 (2001).
30. Carreno, B. & Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 29–53 (2002).
31. Sugiura, D. *et al.* Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science (80-. )*. **364**, 558–566 (2019).
32. Murphy, K., Weaver, C. & Janeway, C. A. *Janeway Immunologie*. (Springer Spektrum, 2018).
33. Anton, L. C. *et al.* Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **12**, 1–27 (2021).
34. Chowell, D. *et al.* Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science* **359**, 582–587 (2018).
35. Paulson, K. G. *et al.* Acquired cancer resistance to combination immunotherapy from transcriptional loss of class I HLA. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
36. Roberts, S. & Girardi, M. Conventional and Unconventional T Cells. *Clin. Basic Immunodermatology* 85–104 (2008) doi:10.1007/978-1-84800-165-7\_6.
37. Arstila, T. P. *et al.* A Direct Estimate of the Human  $\alpha\beta$  T Cell Receptor Diversity | Enhanced Reader. *Science (80-. )*. **286**, 958–960 (1999).
38. La Gruta, N., Gras, S., Daley, S., Thomas, P. & Rossjohn, J. Understanding the drivers



- of MHC restriction of T cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 467–478 (2018).
39. Tikhonova, A. N. *et al.*  $\alpha\beta$  T Cell Receptors that Do Not Undergo Major Histocompatibility Complex-Specific Thymic Selection Possess Antibody-like Recognition Specificities. *Immunity* **36**, 79–91 (2012).
  40. Pellicci, D. G., Koay, H.-F. & Berzins, S. P. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and  $\gamma\delta$  T cells emerge. *Nat. Rev. Immunol.* **2020** **20**, 756–770 (2020).
  41. Winter, S. J. & Krueger, A. Development of Unconventional T Cells Controlled by MicroRNA. *Front. Immunol.* **10**, 1–12 (2019).
  42. Bird, L. MR1-restricted pan-cancer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2020** **203** **20**, 141–141 (2020).
  43. Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., Mccluskey, J., Rossjohn, J. & Moody, D. B. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1114–1123 (2015).
  44. Libero, G. De, Lau, S.-Y. & Mori, L. Phosphoantigen Presentation to TCR  $\gamma\delta$  Cells, a Conundrum Getting Less Gray Zones. *Front. Immunol.* **5**, 1–10 (2015).
  45. Hanada, K.-I., Wang, Q. J., Inozume, T. & Yang, J. C. Molecular identification of an MHC-independent ligand recognized by a human / T-cell receptor. *Blood* **117**, 4816–4825 (2011).
  46. Lubojanski, S. Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell MA-MEL-86. (2012).
  47. Jerome, K. *et al.* Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.* **51**, 2908–16 (1991).
  48. Van Laethem, F. *et al.* Novel MHC-Independent  $\alpha\beta$ TCRs Specific for CD48, CD102, and CD155 Self-Proteins and Their Selection in the Thymus. *Front. Immunol.* **11**, 1–16 (2020).
  49. Doppler, C. N. Identification of target antigens recognized by HLA-independent T cells stimulated with HLA-negative tumor cells. (Johannes Gutenberg-Universität, 2017).
  50. Hercus, T. R. *et al.* The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* **114**, 1289–1298 (2009).
  51. Hansen, G. *et al.* The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell* **134**, 496–507 (2008).
  52. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
  53. Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie.* (Thieme, 2019).
  54. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**, 631–644 (2008).
  55. Puhr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, Y. J. & Liu, K. Dendritic Cell Development – History, Advances, and Open Questions. *Semin. Immunol.* **27**, 388 (2015).
  56. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**, 157–165 (1984).

57. Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A.-M. & Peault, B. *Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 89 (1992).
58. Notta, F. *et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**, 218–221 (2011).
59. Babovic, S. & Eaves, C. J. Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells. *Exp. Cell Res.* **329**, 185–191 (2014).
60. Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485–491 (2008).
61. Pamphilon, D. *et al.* Current practices and Prospects for Standardization of the Hematopoietic Colony-Forming-Unit (CFU) assay: A Report by the Cellular Therapy Team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Cytotherapy* **15**, 255–26 (2013).
62. STEMCELL Technologies. Identification of Colonies Derived from Human Hematopoietic Progenitors. [www.stemcell.com/humancfcwallchart](http://www.stemcell.com/humancfcwallchart) (2017).
63. Van De Laar, L., Coffey, P. J. & Woltman, A. M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: Molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* **119**, 3383–3393 (2012).
64. Hong, I. S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp. Mol. Med.* **48**, (2016).
65. Lang, F. M., M-C Lee, K., Teijaro, J. R., Becher, B. & Hamilton, J. A. GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 507–514 (2020).
66. Montagnani, S. *et al.* Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) biological actions on human dermal fibroblasts. *Eur. J. Histochem.* **45**, 219–228 (2001).
67. Bussolino, F. *et al.* Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* **337**, 471–473 (1989).
68. Ridwan, S., Bauer, H., Frauenknecht, K., von Pein, H. & Sommer, C. Distribution of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and its receptor  $\alpha$ -subunit in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **119**, 1389–1406 (2012).
69. Wognum, A. & Szilvassy, S. J. Hematopoietic stem and progenitor cells. vol. 6.0.0 1–10 (2015).
70. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 533–544 (2008).
71. Goldstein, J. I. *et al.* Defective Leukocyte GM-CSF Receptor (CD116) Expression and Function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **141**, 208–216 (2011).
72. Chiu, C.-Y. *et al.* Whole-Genome Sequencing of a Family with Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Identifies a Rare Structural Variant Involving CSF2RA/CRLF2/IL3RA Gene Disruption. *Nat. Sci. Reports* **7**, 1–9 (2017).
73. Sjöblom, C., Wikland, M. & Robertson, S. A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol. Reprod.* **67**, 1817–1823 (2002).

74. Aliper, A. M., Frieden-Korovkina, V. P., Buzdin, A., Roumiantsev, S. A. & Zhavoronkov, A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med.* **3**, 737–746 (2014).
75. Spielholz, C. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood* **85**, 973–980 (1995).
76. Weng, S. & Zhang, D.-E. The GM-CSF Receptor Alpha Chain (CSF2RA) Functions As a Novel Ligand-Independent Tumor Suppressor in t(8;21) AML. *Blood* **126**, 3589–3589 (2015).
77. Bonaventura, A. *et al.* Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. *Front. Immunol.* **11**, 1–10 (2020).
78. Cremer, P. *et al.* Mavrilimumab in patients with severe COVID-19 pneumonia and systemic hyperinflammation (MASH-COVID): an investigator initiated, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet. Rheumatol.* **3**, e410–e418 (2021).
79. De Luca, G. *et al.* GM-CSF blockade with mavrilimumab in severe COVID-19 pneumonia and systemic hyperinflammation: a single-centre, prospective cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2**, e465–e473 (2020).
80. Burmester, G. *et al.* Mavrilimumab, a Fully Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor  $\alpha$  Monoclonal Antibody: Long-Term Safety and Efficacy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **70**, 679–689 (2018).
81. Urdinguio, R. G. *et al.* Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer Res.* **73**, 395–405 (2013).
82. Hasegawa, A. *et al.* Mutated GM-CSF-based CAR-T cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti-tumor effects against acute myeloid leukaemia. *Clin. Transl. Immunol.* **10**, 1–16 (2021).
83. Larson, R. A. Use of granulocyte colony stimulating factors in adult patients with chemotherapy-induced neutropenia and conditions other than acute leukemia, myelodysplastic syndrome, and hematopoietic cell transplantation. *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/use-of-granulocyte-colony-stimulating-factors-in-adult-patients-with-chemotherapy-induced-neutropenia-and-conditions-other-than-acute-leukemia-myelodysplastic-syndrome-and-hematopoietic-cell-transplantation>.
84. Theyab, A. *et al.* New insight into the mechanism of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) that induces the mobilization of neutrophils. *Hematology* **26**, 628–636 (2021).
85. Tsao, L.-C., Force, J. & Hartman, Z. C. Mechanisms of therapeutic anti-tumor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **21**, 4641–4651 (2021).
86. Pierpont, T., Limper, C. & Richards, K. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* **8**, 1–23 (2018).
87. Nobel Prize. *Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018.* <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/> (2018).
88. Gubin, M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577–581 (2014).
89. Sahin, U. *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific

- therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222–226 (2017).
90. Michels, A., Hartmann, J. & Buchholz, C. J. Chimäre Antigenrezeptoren (CARs) in der Onkologie: eine Übersicht zu klinischer Anwendung und neuen Entwicklungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **63**, 1331–1340 (2020).
  91. June, C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science (80-. )*. **359**, 1361–1365 (2018).
  92. Grupp, S. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *New Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
  93. Yee, C. Adoptive T-cell therapy for cancer: boutique therapy or treatment modality? *Clin. Cancer Res.* **19**, 4550–4552 (2013).
  94. Maher, J. *et al.* The Advent of CAR T-Cell Therapy for Lymphoproliferative Neoplasms: Integrating Research Into Clinical Practice. *Front. Immunol.* **11**, 1–25 (2020).
  95. Brudno, J. N. *et al.* T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* **36**, 2267–2280 (2018).
  96. Zhao, L. & Cao, Y. J. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front. Immunol.* **10**, 1–20 (2019).
  97. Hou, A. J., Chen, L. C. & Chen, Y. Y. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 531–550 (2021).
  98. Kennedy, L. & Salama, A. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 86–104 (2020).
  99. Mollanoori, H., Shahraki, H., Rahmati, Y. & Teimourian, S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Hum. Immunol.* **79**, 876–882 (2018).
  100. Brudno, J. N. & Kochenderfer, J. N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 31–46 (2018).
  101. Liu, J., Zhou, G., Zhang, L. & Zhao, Q. Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Front. Immunol.* **10**, 1–8 (2019).
  102. Gao, Q. *et al.* Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Med.* **8**, 4254–4264 (2019).
  103. Nakazawa, Y. *et al.* Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34+ cells of juvenile myelomonocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 1–11 (2016).
  104. Rosenberg, S. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 299–308 (2008).
  105. Harris, D. T. *et al.* Comparison of T Cell Activities Mediated by Human TCRs and CARs That Use the Same Recognition Domains. *J. Immunol.* **200**, 1088–1100 (2018).
  106. Zhao, Q. *et al.* Engineered TCR-T Cell Immunotherapy in Anticancer Precision Medicine: Pros and Cons. *Front. Immunol.* **12**, 1–12 (2021).
  107. Schumacher, T. & Schreiber, R. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-. )*. **348**, 69–74 (2015).

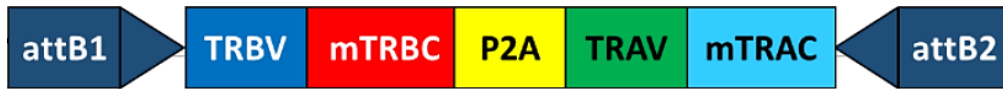
108. Thomas, R. *et al.* NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).
109. Poorebrahim, M. *et al.* TCR-like CARs and TCR-CARs targeting neoepitopes: an emerging potential. *Cancer Gene Ther.* 2021 286 **28**, 581–589 (2021).
110. DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. NOMO-1. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-542>.
111. Klein, E. *et al.* Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int. J. cancer* **18**, 421–431 (1976).
112. Grosche, L. *et al.* The CD83 Molecule - An Important Immune Checkpoint. *Front. Immunol.* **11**, 1–16 (2020).
113. Paschen, A. *et al.* The Coincidence of Chromosome 15 Aberrations and  $\beta$ 2-Microglobulin Gene Mutations Is Causative for the Total Loss of Human Leukocyte Antigen Class I Expression in Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3297–3305 (2006).
114. Schrörs, B. Identifizierung T-zellerkannter mutierter Neoantigene in einem humanen Melanommodell mittels Hochdurchsatzsequenzierung von Exomen und Transkriptomen. (Johannes Gutenberg-Universität, 2015).
115. Drozina, G., Kohoutek, J., Jabrane-Ferrat, N. & Peterlin, B. Expression of MHC II genes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **290**, 147–170 (2005).
116. Derigs, P. Erfassung HLA-unabhängiger , antitumoraler T-Zellantworten durch Stimulation mit menschlichen HLA I / II-negativen Tumorzelllinien im Blut von Melanompatienten. (Johannes Gutenberg-Universität, 2018).
117. ATCC. Phoenix-AMPHO. <https://www.atcc.org/products/crl-3213>.
118. Stanford University. Phoenix system. [https://web.stanford.edu/group/nolan/\\_OldWebsite/retroviral\\_systems/phx.html](https://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/retroviral_systems/phx.html).
119. Ranieri, E., Popescu, I. & Gigante, M. CTL ELISPOT Assay. *Methods Mol. Biol.* **1186**, 75–86 (2014).
120. Spear, T. T. *et al.* Critical biological parameters modulate affinity as a determinant of function in T-cell receptor gene-modified T-cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 1411–1424 (2017).
121. Lorenzo-Herrero, S., Sordo-Bahamonde, C., Gonzalez, S. & López-Soto, A. CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity. *Methods Mol. Biol.* **1884**, 119–130 (2019).
122. Bio Rad Antibodies. Fluorescence Minus One Controls - Flow Cytometry Guide. <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fmo-controls.html>.
123. Szilvassy, S. J. “ Potency ” Assays for Measuring the Engraftment Potential of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells White Paper. vol. 1 (2012).
124. STEMCELL Technologies. MethoCult™ Media for Performing Hematopoietic Colony-Forming Unit (CFU) Assays. (2017).
125. Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**, 65–78 (2003).
126. Karimi, M. A. *et al.* Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay. *PLoS One* **9**, 1–7 (2014).

127. Lozano, M. L. *et al.* Effect of rhG-CSF on the mobilization of CD38 and HLA-DR subfractions of CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Ann. Hematol.* **71**, 105–110 (1995).
128. Burgess, A. W. & Metcalf, D. The Nature and Action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors. *Blood* **56**, 947–958 (1980).
129. Walker, F. & Burgess, A. W. Internalisation and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. *J. Cell. Physiol.* **130**, 255–261 (1987).
130. Geuijen, C. A. W. *et al.* Affinity ranking of antibodies using flow cytometry: Application in antibody phage display-based target discovery. *J. Immunol. Methods* **302**, 68–77 (2005).
131. Yu, X., Pegram, C. N., Bigner, D. D. & Chandramohan, V. Development and validation of a cell-based fluorescent method for measuring antibody affinity. *J. Immunol. Methods* **442**, 49–53 (2017).
132. Kadić, E., Moniz, R. J., Huo, Y., Chi, A. & Kariv, I. Effect of cryopreservation on delineation of immune cell subpopulations in tumor specimens as determined by multiparametric single cell mass cytometry analysis. *BMC Immunol.* **2017** *181* **18**, 1–15 (2017).
133. Gómez-Mora, E. *et al.* Impact of Long-Term Cryopreservation on Blood Immune Cell Markers in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Implications for Biomarker Discovery. *Front. Immunol.* **11**, 1–13 (2020).
134. Sattui, S. *et al.* Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **82 B**, 54–58 (2012).
135. Aoki, T. *et al.* Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner. *Cancer Sci.* **111**, 2223–2233 (2020).
136. Marshall, N. B. & Swain, S. L. Cytotoxic CD4 T Cells in Antiviral Immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 1–8 (2011).
137. Appay, V. *et al.* Characterization of CD4 + CTLs Ex Vivo. *J. Immunol.* **168**, 5954–5958 (2002).
138. Brown, D. M., Kamperschroer, C., Dilzer, A. M., Roberts, D. M. & Swain, S. L. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell. Immunol.* **257**, 69–79 (2009).
139. Shen, D. T., Ma, J. S. Y., Mather, J., Vukmanovic, S. & Radoja, S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 827–837 (2006).
140. Horton, H. *et al.* Correlation between interferon- $\gamma$  secretion and cytotoxicity, in virus-specific memory T cells. *J. Infect. Dis.* **190**, 1692–1696 (2004).
141. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **8**, 1–7 (2017).
142. Richardson, J. R., Schöllhorn, A., Gouttefangeas, C. & Schuhmacher, J. CD4+ T Cells: Multitasking Cells in the Duty of Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–19 (2021).
143. Takeuchi, A. *et al.* CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp.*

- Med.* **213**, 123 (2016).
144. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–367 (2013).
145. Han, Z. *et al.* The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci.* **2**, 1–8 (2012).
146. Watchmaker, P. B. *et al.* Memory CD8+ T Cells Protect Dendritic Cells from CTL Killing. *J. Immunol.* **180**, 3857–3865 (2008).
147. Zaritskaya, L., Shurin, M. R., Sayers, T. J. & Malyguine, A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 1–26 (2010).
148. Ranasinghe, S. *et al.* Antiviral CD8 + T Cells Restricted by Human Leukocyte Antigen Class II Exist during Natural HIV Infection and Exhibit Clonal Expansion. *Immunity* **45**, 917–930 (2016).
149. Boyle, L. H., Goodall, J. C. & Gaston, J. S. H. Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells. *Immunology* **112**, 54–63 (2004).
150. Cossarizza, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies\*. *Eur. J. Immunol.* **47**, 1584–1797 (2017).
151. Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L. & Chen, H. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**, 3834 (2013).
152. Huntsman, H. D. *et al.* Human hematopoietic stem cells from mobilized peripheral blood can be purified based on CD49f integrin expression. *Blood* **126**, 1631–1633 (2015).
153. Yoo, K. H. *et al.* The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 515–521 (2007).
154. Christopeit, M. *et al.* Prophylaxis, diagnosis and therapy of infections in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantation. 2020 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann. Hematol.* **100**, 321–336 (2021).
155. Mansilla-Soto, J. *et al.* HLA-independent T cell receptors for targeting tumors with low antigen density. *Nat. Med.* **28**, 345–352 (2022).
156. Lanza, R., Russell, D. W. & Nagy, A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 723–733 (2019).
157. Kröger, N., Burchert, A., Niederwieser, D. & Wulf, G. Konditionierung - Allogene Stammzelltransplantation.  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/konditionierung/@@guideline/html/index.html> (2020).
158. Yu, S., Yi, M., Qin, S. & Wu, K. Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity. *Mol. Cancer* **18**, 1–13 (2019).
159. Crescioli, S. *et al.* IgG4 Characteristics and Functions in Cancer Immunity. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **16**, 1–11 (2016).

## 8 Anhang

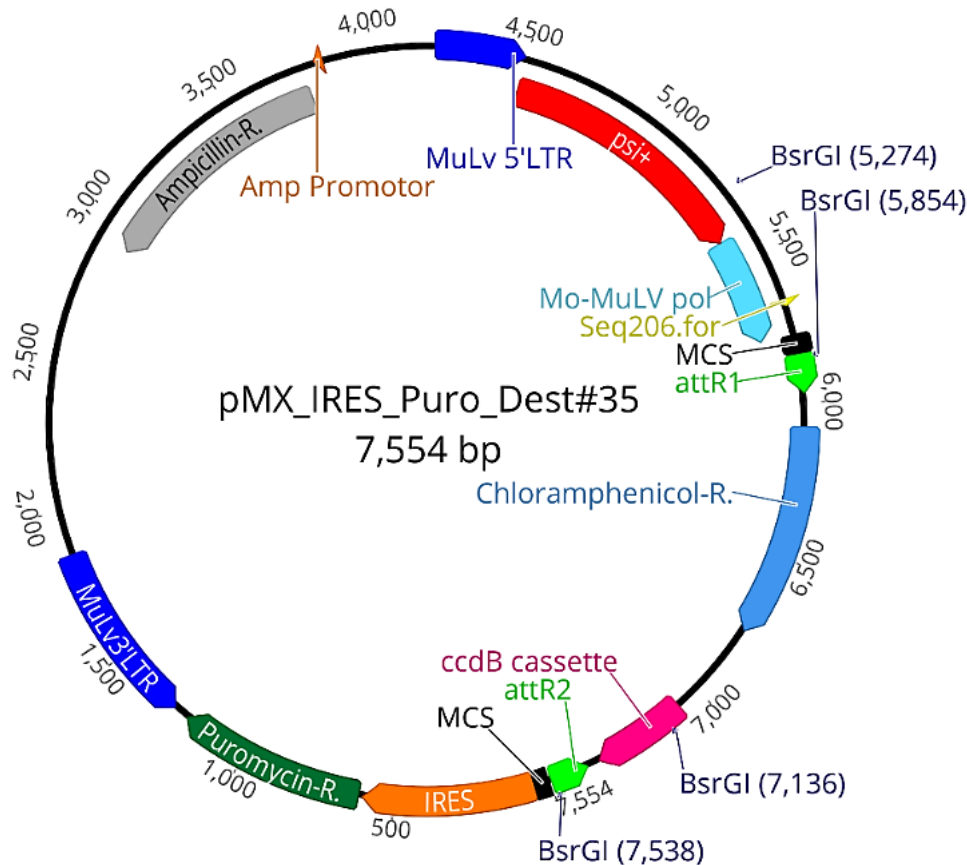
### 8.1 Schematische Darstellung der cTCR-Expressionskonstrukte



**Abbildung 32: Schematische Darstellung des Expressionsprodukts der cTCRs gegen CSF2RA und TRP2.** Das cTCR-Expressionsprodukt enthält die Sequenzen der variablen Regionen humaner  $\beta$ - und  $\alpha$ -Ketten (TRBV, TRAV) und die Sequenzen der konstanten Regionen muriner  $\beta$ - und  $\alpha$ -Ketten (mTRBC, mTRAC), die durch ein P2A-Element verbunden sind. Die flankierenden attB1- und attB2-Sequenzen dienen der Gateway-Klonierung des cTCR in den Destinations-Vektor pMX\_IRES\_Puro\_Dest#35). Die cTCRs gegen CSF2RA und TRP2 wurden freundlicherweise von Catherine Wölfel zur Verfügung gestellt. Die Abbildung entstammt der Masterarbeit von Tim J. Schäufele (2019). Abkürzungen: att: engl. attachment site TRBV: engl. T-cell receptor beta chain, variable region mTRBC: murine T-cell receptor beta chain, constant region TRAV: T-cell receptor alpha chain, variable region mTRAC: murine T-cell receptor alpha chain, constant region



## 8.2 Die Vektorkarten der retroviralen Vektoren pMX\_IRES\_Puro\_Dest#35 und pMX\_IRES\_NEO\_Dest#9

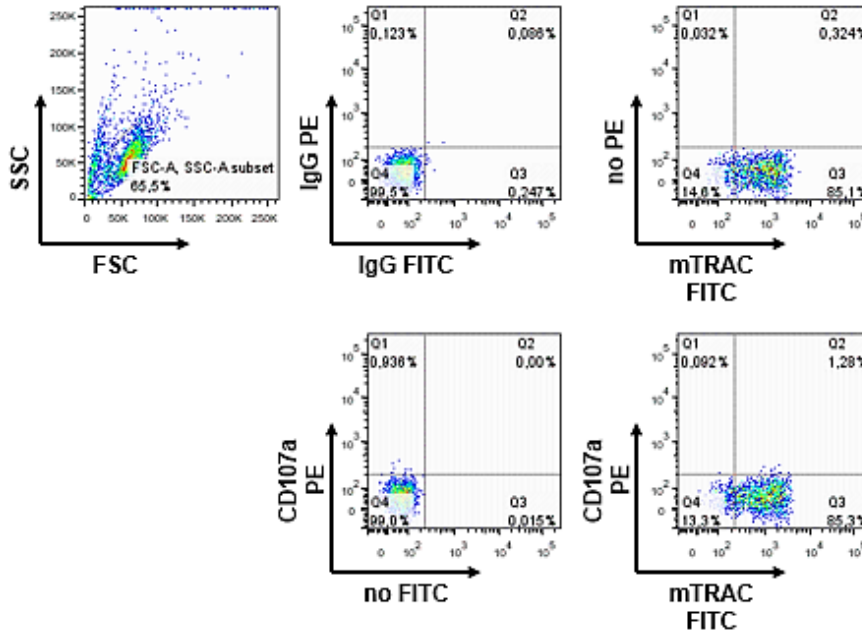


**Abbildung 33: Vektorkarte des retroviralen Vektors pMX\_IRES\_Puro\_Dest#35/ pMX\_IRES\_Neo\_Dest#9.** Der molekulare Aufbau beider Vektoren ist beispielhaft anhand des pMX\_IRES\_Puro\_Dest#35 dargestellt. pMX-IRES-Puro-Dest#35 (pMX-Puro-DEST) diente innerhalb dieser Arbeit als Vektor bei der retroviralen Transduktion der Leukapheresat-Zellen mit den exogenen cTCR gegen CSF2RA und TRP2. Innerhalb des Vektors befindet sich ein Ampicillin-Resistenz-Gen (grau) mit Promotor (orange) zur Selektion von *E. coli* und ein Puromycin-Resistenz-Gen (dunkelgrün) zur Selektion transgener eukaryontischer Zellen, dessen Expression durch eine IRES-Sequenz (orange) (engl. internal ribosomal entry site) vermittelt wird. Außerdem enthält der Vektor ein retrovirales Psi packaging element und das Gen pol, welches für eine Reverse Transkriptase und Integrase kodiert. Durch die Integrase wird der LTR-flankierte (engl. long terminal repeats; dunkelblau) Bereich in das Genom der Zielzelle stabil integriert. Durch C. Wölfel wurde in die MCS (engl. multiple cloning site; schwarz) des Vektors eine ccdB-Kassette (pink) zur negativen Selektion von rekombinanten *E. coli*, ein Chloramphenicol-Resistenz-Gen (CmR, blau) und flankierende attR- Sequenzen (hellgrün) eingefügt. Mittels LR-Reaktion (Gateway-Technologie) konnte eine TCR-Sequenz vom VBB in pMX-Puro-DEST überführt werden (Abb. 32). Der Vektor-spezifische Primer Seq206.for wurde zur Sequenzierung der TCR-Sequenz und in der Kolonie-PCR verwendet. Die Erkennungsstellen für die Endonuklease BsrGI (5'-T>GTAC<A-3') wurden zur Restriktionsanalyse der TCR-Sequenz genutzt. Der molekulare Aufbau des Vektors pMX\_IRES\_Neo\_Dest#9 war fast identisch zu dem des pMX\_IRES\_Puro\_DEST#35, jedoch enthielt er anstelle des Puromycin-Resistenzgens ein Resistenzgen gegen Neomycin. Die Abbildung der Vektorkarte entstammt der Masterarbeit von Tim J. Schäufele (2019). Der Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Wölfel.

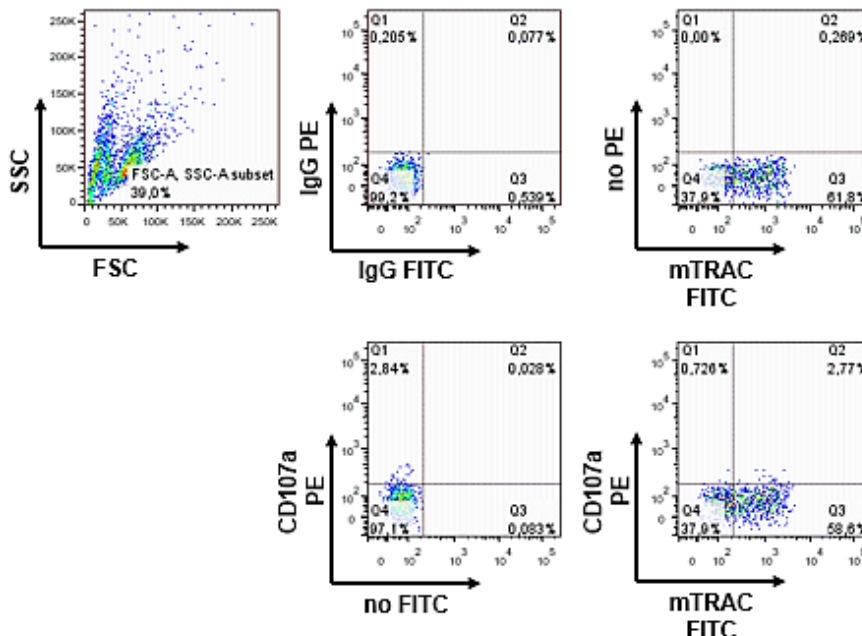
### 8.3 Abbildungen der durchflusszytometrischen Analysen der CD107a-Degranulations-Assays

#### 8.3.1 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1

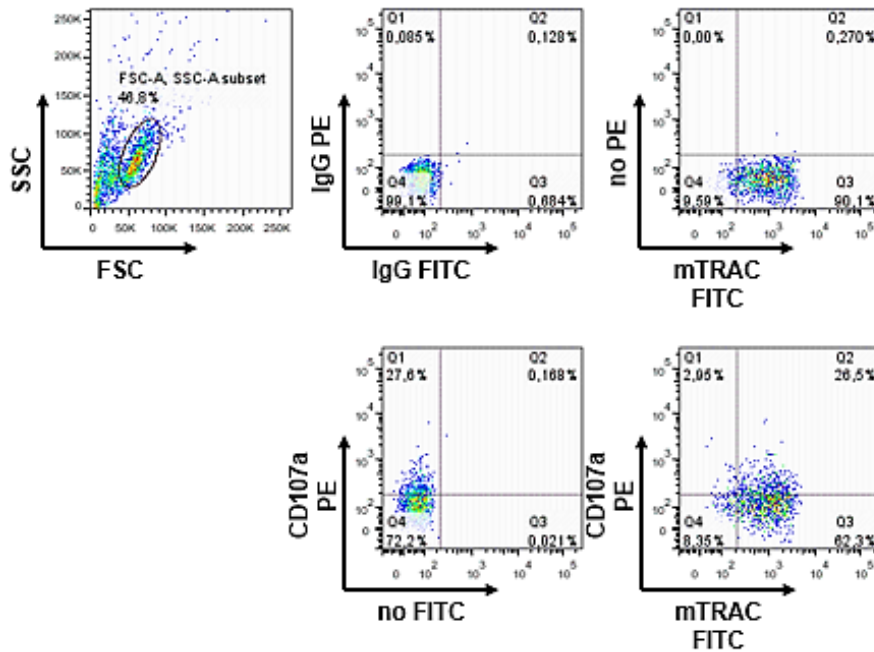
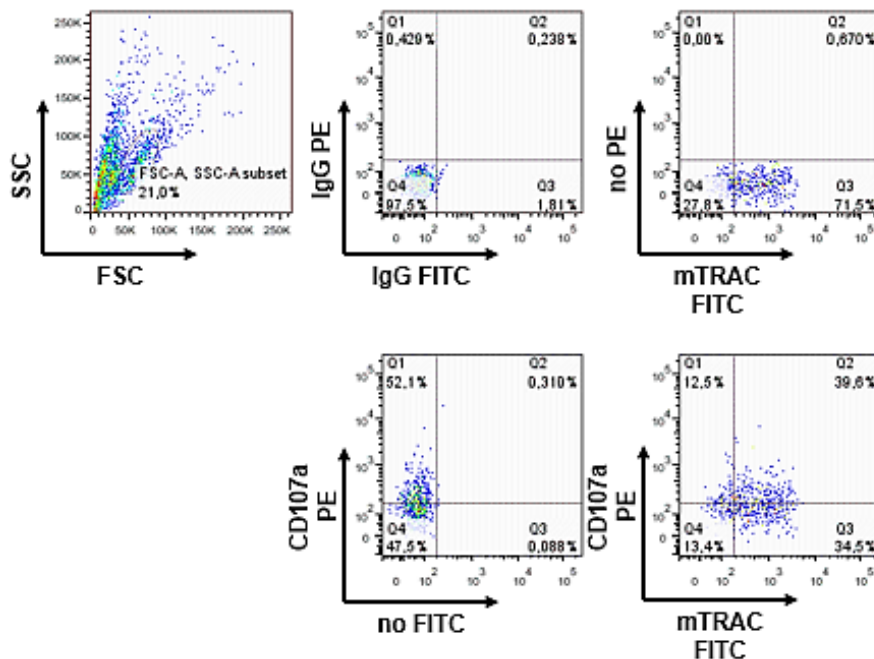
##### A CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA



##### B CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2

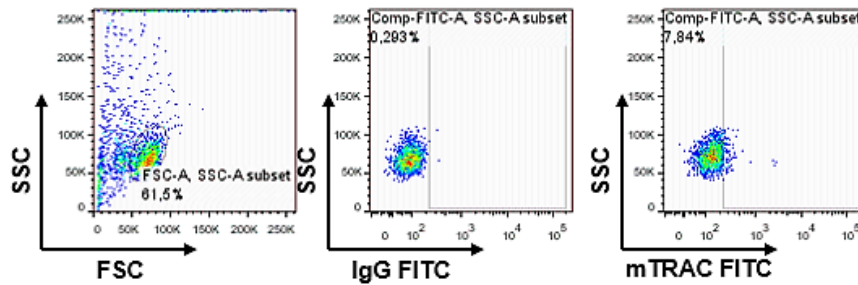


**Abbildung 34: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen ohne Targets.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die spontane Sekretion lysischer Granula der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA (A) und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 (B) ohne Antigenkontakt untersucht. Zunächst wurden die vitalen Zellen identifiziert und diese anschließend untersucht. Als Degranulationsmarker diente das lysosomale Membranmolekül CD107a, welches mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen wurde, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für jede Probe eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one

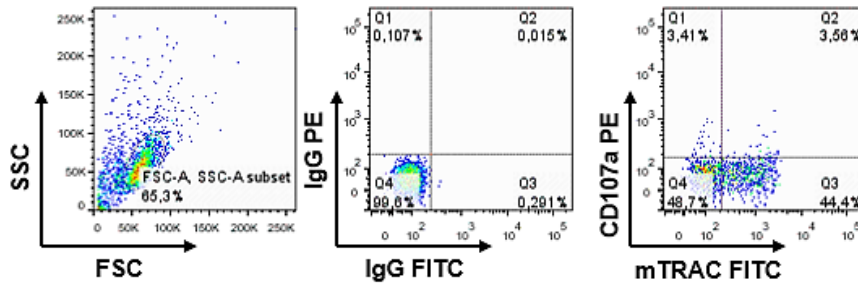
**A CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA + PMA/I****B CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 + PMA/I**

**Abbildung 35: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Inkubation mit PMA/Ionomycin.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die Sekretion lytischer Granula der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA (**A**) und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 (**B**) sechs Stunden nach Stimulation mit PMA/Ionomycin untersucht. Die als vital identifizierte Zellen wurden weiter untersucht. Das lysosomale Membranmolekül CD107a diente als Degranulationsmarker und wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für jede Probe eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one

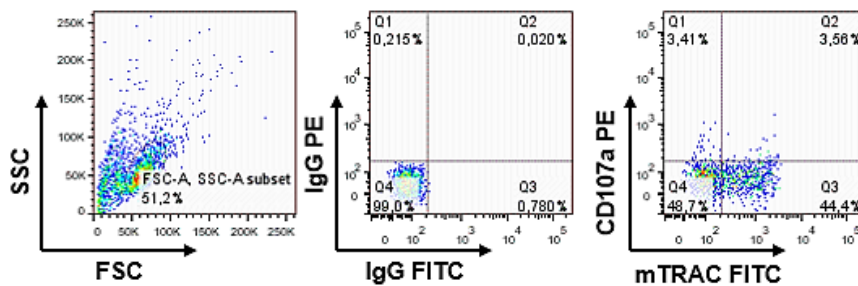
### A CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen



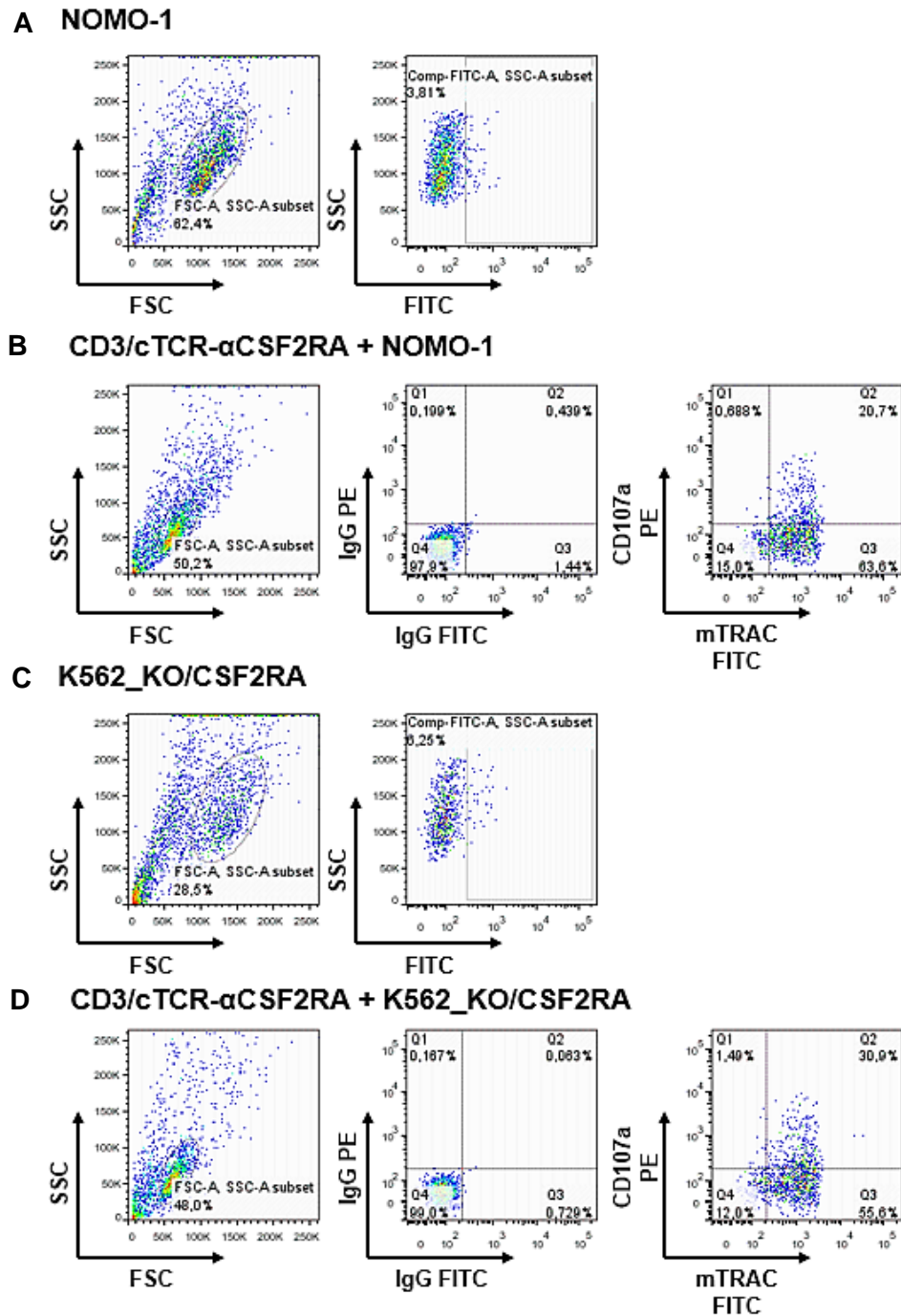
### B CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA + CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen



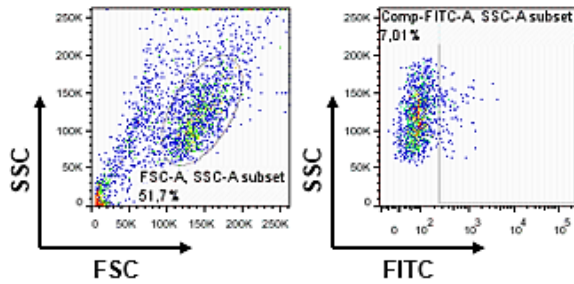
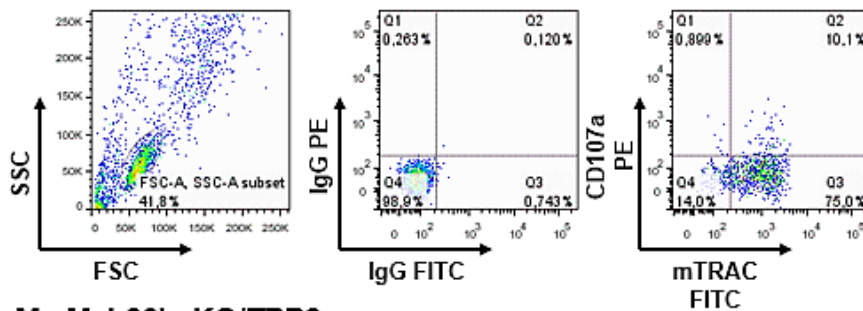
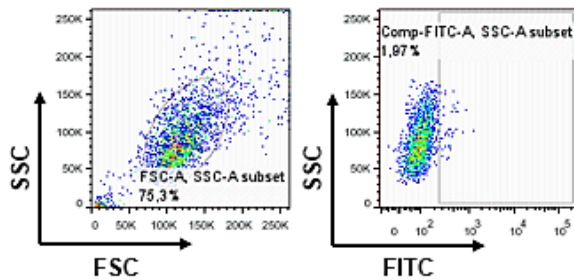
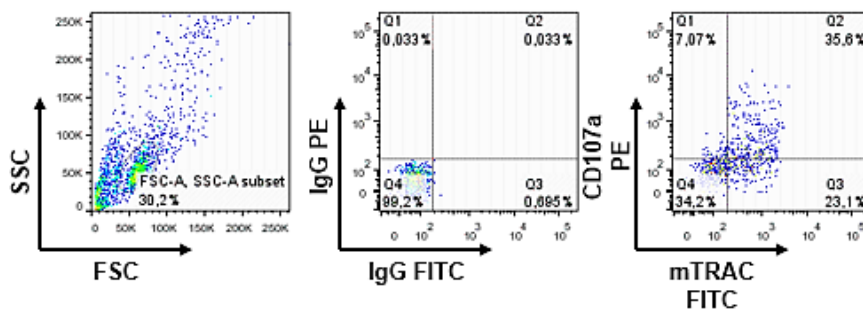
### C CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 + CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen



**Abbildung 36: CD107a-Degradations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen.** Nach sechsständiger Co-Inkubation der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA (B) und CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 (C) mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen wurde die Sekretion lytischer Granula über die Expression des lysosomalen Membranmoleküls CD107a durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurde die Darstellung der hämatopoetischen Zellen ohne Effektoren und der Anteil vitaler Zellen in FSC/SSC analysiert (A). Der Assay wurde 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 durchgeführt. CD107a wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper. Zusätzlich wurden für jede Probe eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: fluorescence minus one

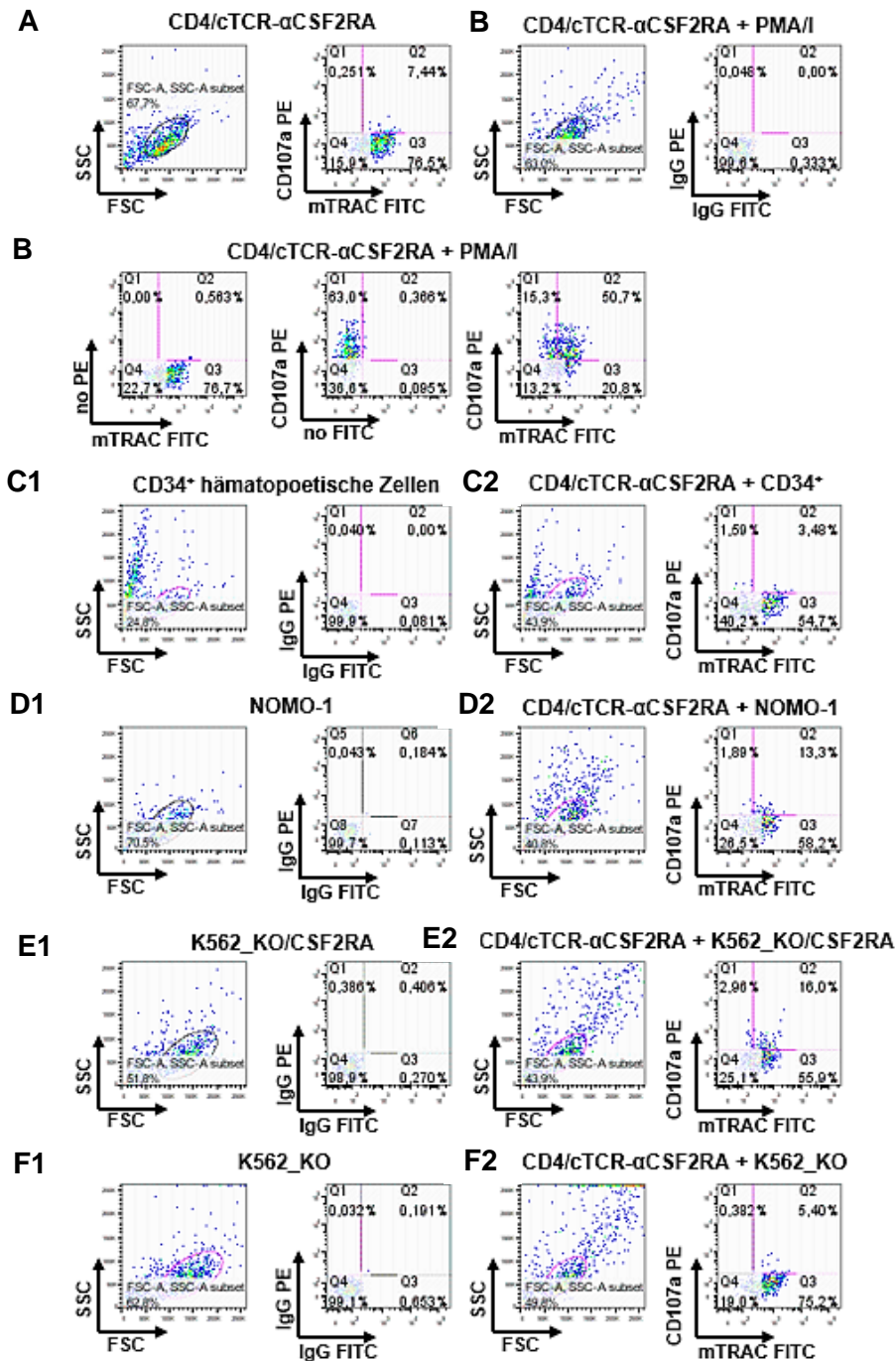


**Abbildung 37: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit NOMO-1 und K562\_KO/CSF2RA.** Die Sekretion lytischer Granula wurde über die Expression des lysosomalen Membranmoleküls CD107a durchflusszytometrisch untersucht. Der Assay wurde 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 durchgeführt. CD107a wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper. Zusätzlich wurden für jede Probe eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. **A:** Darstellung der NOMO-1 in FSC/SSC ohne Effektoren und Identifizierung vitaler Zellen. **B:** CD107a-Expression der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach sechsständiger Co-Inkubation mit NOMO-1. **C:** Darstellung der K562\_KO/CSF2RA in FSC/SSC ohne Effektoren und Identifizierung vitaler Zellen. **D:** CD107a-Expression der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach sechsständiger Co-Inkubation mit K562\_KO/CSF2RA. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: fluorescence minus one

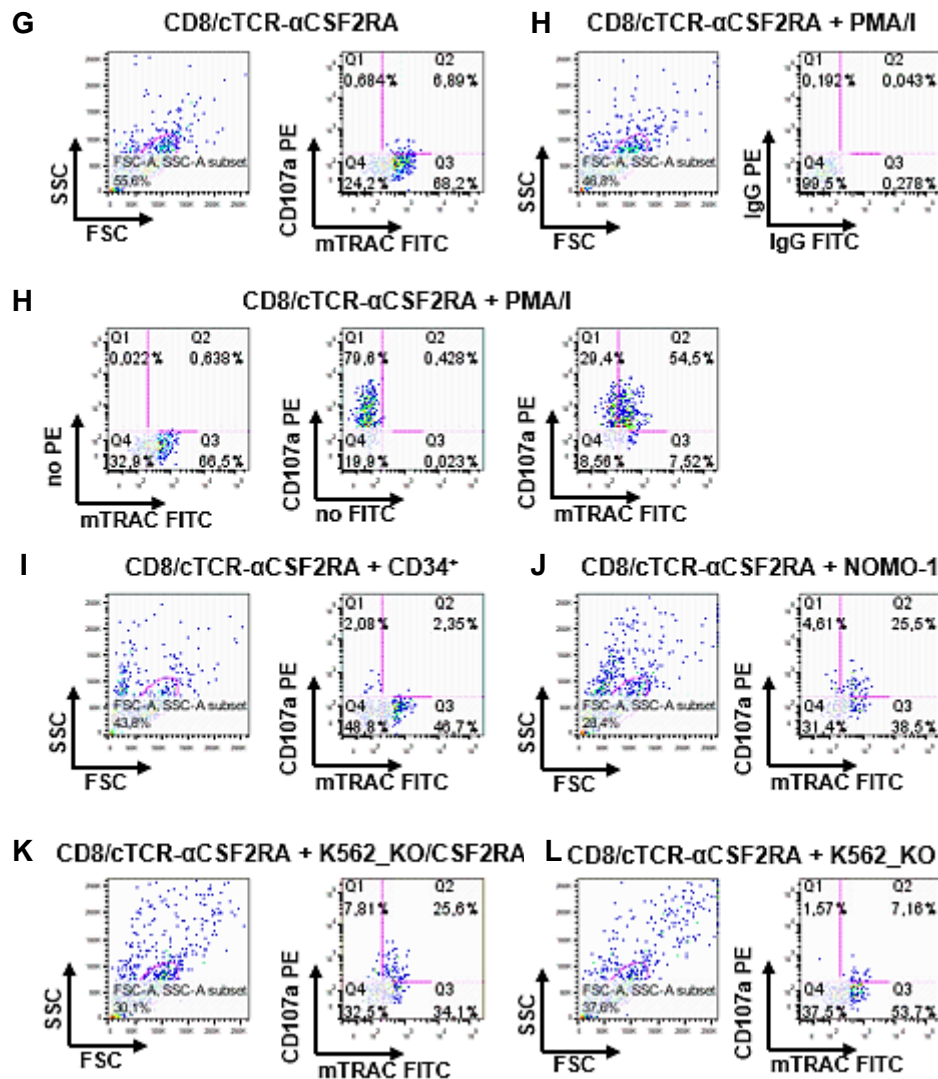
**A K562\_KO****B CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA + K562\_KO****C Ma-Mel-86b\_KO/TRP2****D CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 + Ma-Mel-86b\_KO/TRP2**

**Abbildung 38: CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 1 - cTCR-T-Zellen nach sechsständiger Co-Inkubation mit K562\_KO und Ma-Mel-86b\_KO/TRP2.** Die Sekretion lytischer Granula wurde über die Expression des lysosomalen Membranmoleküls CD107a durchflusszytometrisch untersucht. Der Assay wurde 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA bzw. Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 durchgeführt. CD107a wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper. Zusätzlich wurden für jede Probe eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. **A:** Darstellung der K562\_KO in FSC/SSC ohne Effektoren und Identifizierung vitaler Zellen. **B:** CD107a-Expression der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach sechsständiger Co-Inkubation mit K562\_KO. **C:** Darstellung der Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 in FSC/SSC ohne Effektoren und Identifizierung vitaler Zellen. **D:** CD107a-Expression der CD3/cTCR- $\alpha$ TRP2 nach sechsständiger Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: fluorescence minus one

## 8.3.2 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 2

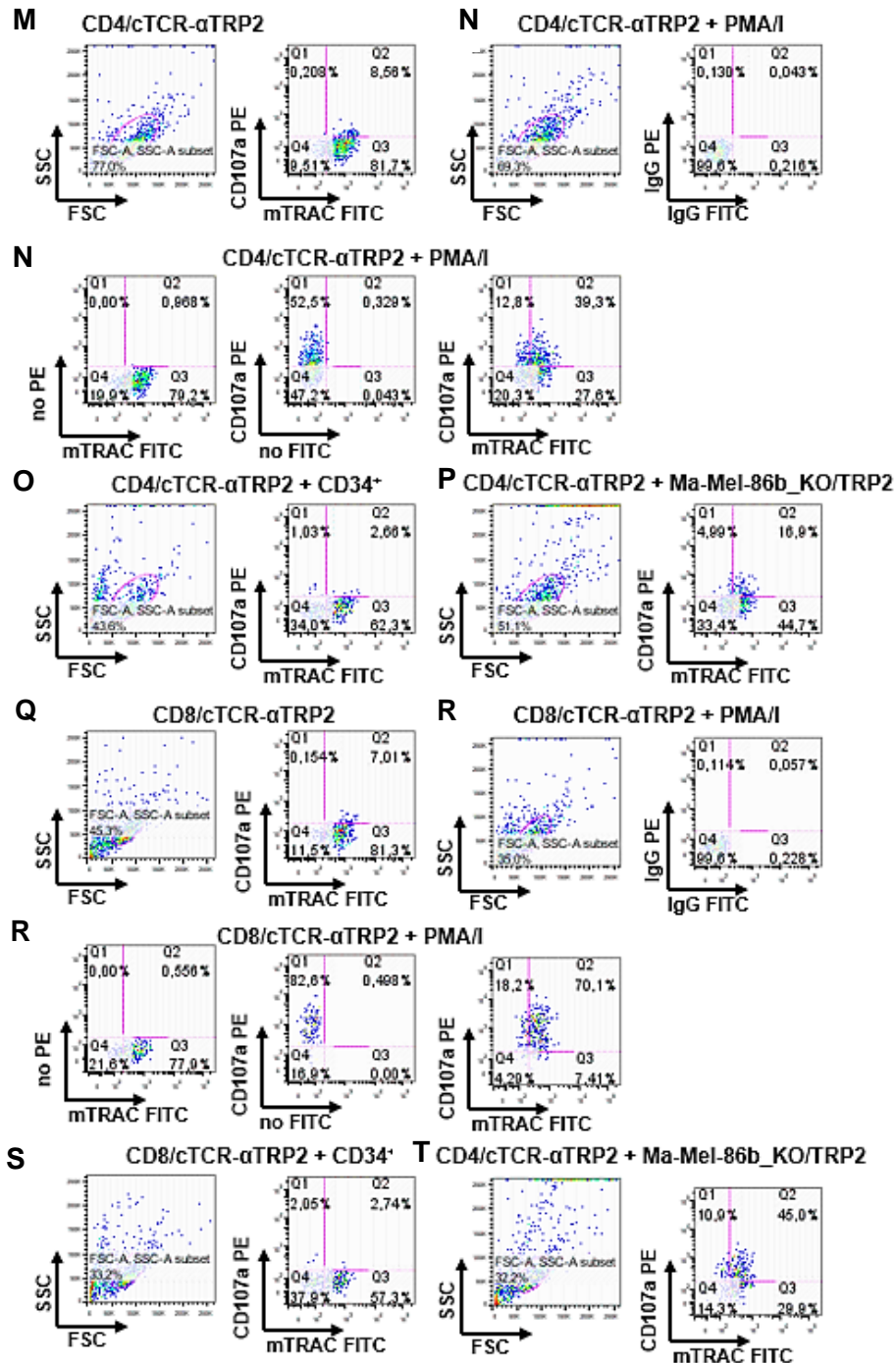


**Abbildung 39: CD107a-Degranulations-Assay mit CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA wurde die Sekretion lytischer Granula der CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach sechsständiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets untersucht. Zunächst wurden in FSC/SSC die vitalen T-Zellen identifiziert und diese anschließend bezüglich ihrer cTCR-Expression und ihres Degranulationsverhaltens untersucht. Das lysosomale Membranmolekül CD107a diente als Degranulationsmarker und wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für alle Effektoren und Targets IgG1-Kontrollen mitgeführt. **A-F:** CD4/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden als Effektoren eingesetzt. **A:** Ohne Stimulation. **B:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **C1:** CD34<sup>+</sup> Zellen ohne T-Zell-Kontakt. **C2:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **D1:** NOMO-1 ohne T-Zell-Kontakt. **D2:** Co-Inkubation mit NOMO-1. **E1:** K562\_CO/CSF2RA ohne T-Zell-Kontakt. **E2:** Co-Inkubation mit K562\_CO/CSF2RA. **F1:** K562\_KO/CSF2RA ohne T-Zell-Kontakt. **F2:** Co-Inkubation mit K562\_KO. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one



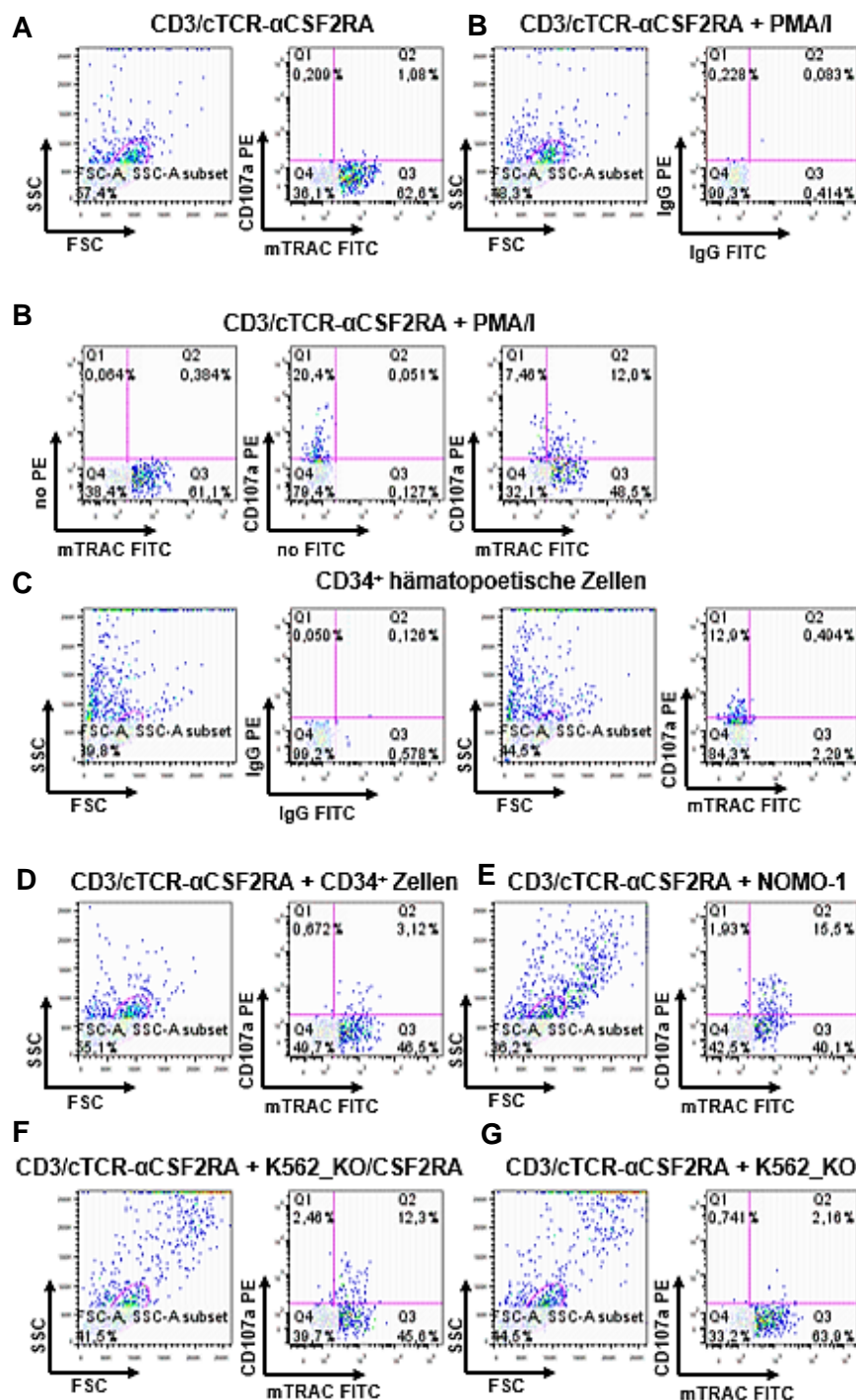
**Abbildung 40: CD107a-Degranulations-Assay mit CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 2.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA wurde die Degranulation der CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA nach sechsstündiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets untersucht. Zunächst wurden in FSC/SSC die vitalen T-Zellen identifiziert und diese anschließend bezüglich ihrer cTCR-Expression und ihres Degranulationsverhaltens untersucht. Das lysosomale Membranmolekül CD107a diente als Degranulationsmarker und wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für alle Effektoren und Targets IgG1-Kontrollen mitgeführt. **G-L:** CD8/cTCR- $\alpha$ CSF2RA wurden als Effektoren eingesetzt. **G:** Ohne Stimulation. **H:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **I:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **J:** Co-Inkubation mit NOMO-1. **K:** Co-Inkubation mit K562\_CO/CSF2RA. **L:** Co-Inkubation mit K562\_KO. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one



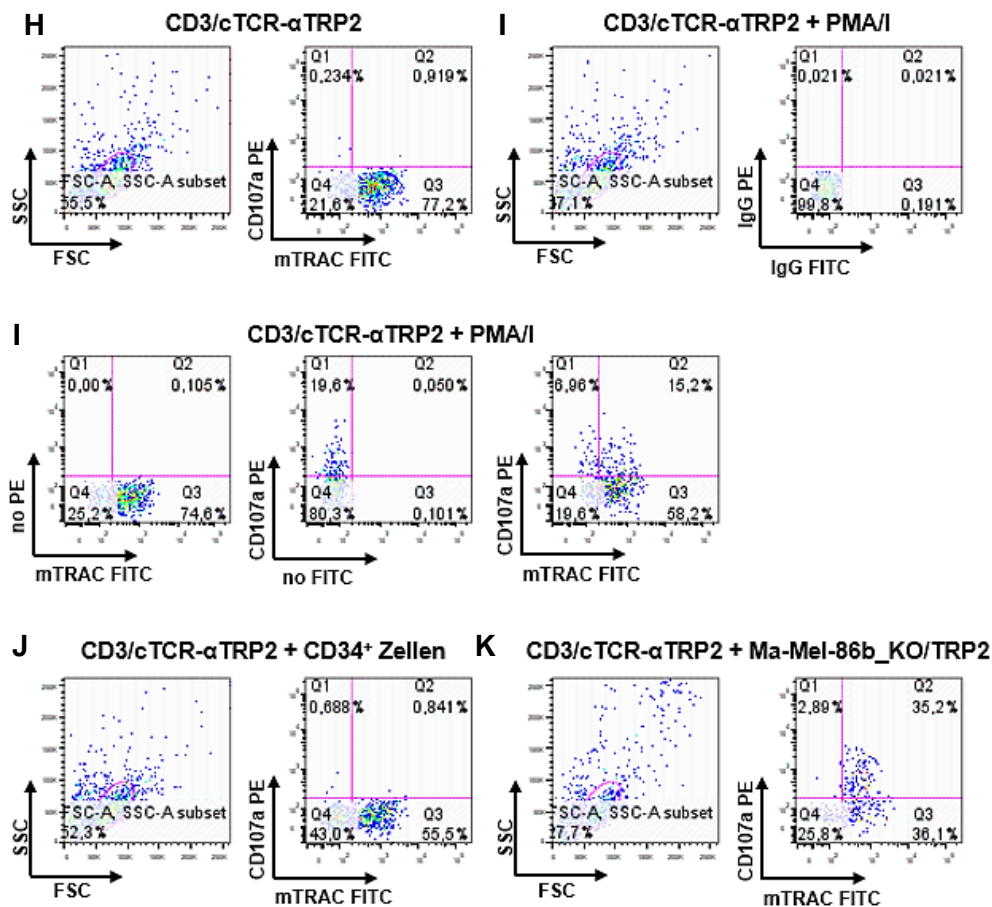


**Abbildung 41: CD107a-Degranulations-Assay mit CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 des Spenders 2.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die Sekretion lytischer Granula der CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 und CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2 nach sechsstündiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets untersucht. Zunächst wurden in FSC/SSC die vitalen T-Zellen identifiziert und diese anschließend bezüglich ihrer cTCR-Expression und ihres Degranulationsverhaltens untersucht. Das lysosomale Membranmolekül CD107a diente als Degranulationsmarker und wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für alle Effektoren und Targets IgG1-Kontrollen mitgeführt. **M-P:** CD4/cTCR- $\alpha$ TRP2 wurden als Effektoren eingesetzt. **M:** Ohne Stimulation. **N:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **O:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **P:** Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. **Q-T:** Effektorzellen waren CD8/cTCR- $\alpha$ TRP2. **Q:** Ohne Stimulation. **R:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **S:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **T:** Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one

## 8.3.3 CD107a-Degranulations-Assay des Spenders 3



**Abbildung 42: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA des Spenders 3.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/CSF2RA wurde die Sekretion lytischer Granula der CD3/cTCR- $\alpha$ CSF2RA untersucht. Zunächst wurden die vitalen Effektorzellen identifiziert und diese anschließend bezüglich ihrer cTCR- $\alpha$ CSF2RA-Expression und Degranulation untersucht. Als Degranulationsmarker diente das lysosomale Membranmolekül CD107a, welches mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen wurde, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden eine IgG1-Kontrolle sowie FMO-Kontrollen mitgeführt. **A:** Ohne Stimulation. **B:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **C:** CD34<sup>+</sup> Zellen ohne T-Zell-Kontakt. **D:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **E:** Co-Inkubation mit NOMO-1. **F:** Co-Inkubation mit K562\_CO/CSF2RA. **G:** Co-Inkubation mit K562\_KO. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one



**Abbildung 43: CD107a-Degranulations-Assay mit CD3/cTCR-αTRP2 des Spenders 3.** 12 Tage nach cTCR-spezifischer Stimulation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2 wurde die Sekretion lytischer Granula der CD3/cTCR-αTRP2 nach sechsstündiger Co-Inkubation mit verschiedenen Targets untersucht. Zunächst wurden die vitalen Zellen in FSC/SSC identifiziert und diese anschließend hinsichtlich ihrer cTCR-Expression und ihres Degranulationsverhaltens untersucht. Das lysosomale Membranmolekül CD107a diente als Degranulationsmarker und wurde mittels PE-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen, die cTCR-Expression wurde mittels FITC-gekoppeltem anti-mTRAC-Antikörper nachgewiesen. Zusätzlich wurden für alle Effektoren und Targets IgG1-Kontrollen mitgeführt. **H:** Ohne Stimulation. **I:** Unspezifische Stimulation durch PMA/I. FMO-Kontrollen wurden mitgeführt. **J:** Co-Inkubation mit autologen CD34<sup>+</sup> Zellen. **K:** Co-Inkubation mit Ma-Mel-86b\_KO/TRP2. Abkürzungen: mTRAC: engl. murine T-cell receptor alpha chain constant region FSC: engl. forward scatter SSC: engl. side scatter FMO: engl. fluorescence minus one

