

Analyse der Neoantigenverteilung, -präsentation und -erkennung durch impfstoffinduzierte spezifische T-Zellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Germano Amorelli
aus Bietigheim-Bissingen

Tübingen
2025

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

17.10.2025

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter/-in:

apl. Prof. Dr. Peter Lang

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	14
1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Relevanz der Arbeit	17
1.1 Immunologische Grundlagen: Aufbau und Funktion des Immunsystems ...	19
1.1.1 Evolution und Grundprinzipien der Immunabwehr.....	20
1.1.2 Das angeborene Immunsystem und seine Rolle in der Tumorummunologie	21
1.1.3 Das adaptive Immunsystem und seine funktionelle Spezialisierung	24
1.1.4 MHC-Moleküle, Antigenpräsentation und Immunevasion	31
1.2 Immunüberwachung und Immunevasion von Tumoren	38
1.2.1 Phasen der Immunüberwachung - das Immunoediting-Modell	39
1.2.2 Immunevasionsstrategien von Tumoren	41
1.2.3 Therapeutische Relevanz tumorassoziierter Immunevasionmechanismen.. ..	44
1.3 Neoantigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie	46
1.3.1 Entstehung und Eigenschaften von Neoantigenen.....	46
1.3.2 Identifikation von Neoantigenen	47
1.3.3 Neoantigen-basierte Immuntherapien.....	49
1.3.4 Limitationen und Perspektiven Neoantigen-basierter Therapien	52
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	54
2 Material und Methoden	56
2.1 Materialien	56
2.1.1 Verwendete Geräte.....	56
2.1.2 Verbrauchsmaterialien sowie Glas- und Kunststoffwaren.....	57
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	58
2.1.4 Biologisches Zellmaterial und klinisches Probenmaterial von Patientinnen und Patienten.....	64
2.1.5 Oligonukleotide	66
2.1.6 Verwendeter Transformationsvektor	66
2.1.7 Transformationsstamm <i>E. coli DH5 α</i>	66
2.1.8 Patientinnen und Patienten sowie zugehörige Studienkontexte	67
2.1.9 Primärzellmaterial	67
2.1.10 Verwendete Zelllinien	68
2.1.11 Antikörper.....	69
2.1.12 Verwendete Software	70
2.2 Zellbiologische Methoden.....	71
2.2.1 Prokaryoten	71
2.2.2 Eukaryoten	72

2.3	Analytische Verfahren	75
2.3.1	Durchflusszytometrische Analyse (FACS)	75
2.4	Präparative Methoden	78
2.4.1	Antigenspezifische Aktivierung und Expansion von T-Zellen.....	79
2.4.2	Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen.....	80
2.4.3	Etablierung klonaler T-Zellpopulationen.....	80
2.4.4	Funktionelle Testung antigenspezifischer T-Zellen in der <i>Blasten-Challenge</i>	81
2.4.5	Indexsortierung peptidaktiver T-Zellen zur TCR-Sequenzierung	82
2.4.6	Kriterien und Auswahl der Impfpeptide	92
2.4.7	CRISPR-Cas9-vermittelter orthotoper TCR-Austausch: Etablierung und Anwendung.....	93
2.4.8	Tetramerbasierte Validierung der Peptidbindung transgener TCRs	101
3	Ergebnisse.....	102
3.1	Einzellsortierung und Charakterisierung impfreaktiver T-Zellen	103
3.1.1	Strategie zur Einzelzellsortierung antigenreaktiver T-Zellen	103
3.1.2	Phenotypische Charakterisierung der sortierten T-Zellen	104
3.1.3	Klonalität und Diversität der T-Zellpopulationen	104
3.2	Etablierung des OTR-Systems in Tübingen	120
3.2.1	Ziel der Methodenetablierung.....	120
3.2.2	CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration und anschließende Sortierung mittels Tyto.....	120
3.2.3	Funktionelle Validierung der generierten OTR-TCRs.....	123
3.3	Funktionelle Charakterisierung transgener, neoantigenspezifischer TCRs in Jurkat-TPR-Zellen.....	127
3.3.1	Funktionelle Validierung der IVAC-ALL-1 TCRs mittels OTR	127
3.4	Quantitative Analyse der HLA-Expression auf B-Zell-Blasten (QIFIKIT)...	135
3.5	<i>In vitro</i> Challenge mit autologen Blasten zur Aktivierung impfspezifischer T-Zellen.....	136
3.6	Immunomonitoring der IVAC-RCC-001-Vakzinierungsstudie	139
3.6.1	Peptidselektion und Impfstoffzusammensetzung	139
3.6.2	<i>Gating</i> -Strategie und Immunomonitoring	140
4	Diskussion.....	144
4.1	Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse	145
4.2	Einordnung in den Kontext bestehender Studien zur TCR-basierten Immuntherapie.....	147
4.3	Funktionelle Analyse transgener neoantigenspezifischer TCRs	150
4.3.1	Funktionelle Testung IVAC-ALL-1-abgeleiteter TCRs im OTR-System..	151
4.3.2	Relevanz der Ergebnisse für die Weiterentwicklung TCR-basierter Immuntherapien.....	154
4.4	Klinische Relevanz neoantigenspezifischer TCRs und Perspektiven für personalisierte Immuntherapien.....	157

4.4.1	Spezifitätsanalysen und funktionelle Sicherheitsbewertung neoantigenspezifischer TCRs	159
4.4.2	Affinitätsmodulation und funktionelle Optimierung neoantigenspezifischer TCRs	161
4.4.3	Klinische Translation neoantigenspezifischer TCRs - Herausforderungen und Perspektiven.....	162
4.4.4	Personalisierte Immuntherapien: Perspektiven und künftige Anwendungen	165
4.5	Ausblick.....	167
4.5.1	Sicherheitsrelevante Aspekte peptidspezifischer TCRs in der klinischen Entwicklung.....	168
4.5.2	Affinitätsoptimierung und funktionelle Verstärkung peptidspezifischer TCRs	169
4.5.3	Technologische Innovationen als Wegbereiter zukünftiger TCR-Therapien	170
4.6	Schlussfolgerung	171
5	Literaturverzeichnis	173
6	Anhang.....	182
6.1	Publikationen	182
6.1.1	Originalpublikationen	182
6.1.2	Konferenzen.....	182
6.2	Sequenzinformationen und struktureller Aufbau des TCR-Konstrukts	183
6.2.1	Vollständige TCR Sequenzen	183
6.2.2	Strukturelle Organisation des HDR-Templates.....	183
6.2.3	Vektor- und Plasmidinformation	185
6.3	Danksagung.....	186
7	Erklärung	187

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und intrazelluläre Signaltransduktion.....	26
Abbildung 2 Differenzierung naiver CD4 ⁺ -T-Zellen in funktionell spezialisierte Subtypen.	29
Abbildung 3 Prozessierung und Präsentation endogener Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle.....	32
Abbildung 4 Antigenaufnahme und Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle...	34
Abbildung 5 Kreuzpräsentation exogener Antigene durch dendritische Zellen.....	37
Abbildung 6 Exemplarische Gating-Strategie zur Einzelzellsortierung impfstoffreaktiver T-Zellen für die TCR-Sequenzierung.	91
Abbildung 7 Schematischer Überblick zur Identifikation impfstoffinduzierter T-Zell-Rezeptoren im Rahmen der IVAC-ALL-1-Analyse.....	94
Abbildung 8 Klonverteilung der CD4 ⁺ - T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit dem Peptid ZCCHC3 D269fs.	107
Abbildung 9 Klonverteilung der CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit den Peptiden FGL1 T279A und L3MBTL4 M188I.	108
Abbildung 10 Klonverteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0106 nach Stimulation mit dem Peptid SP100 F712L.	109
Abbildung 11 Klonverteilung der CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V.....	110
Abbildung 12 Klonverteilung der CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit den Peptiden CIC A320S und EXOC4 R574P. .	112
Abbildung 13 Klonverteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit den Peptiden AEBP1 R854P und SORL1 C1403G....	114
Abbildung 14 Klonverteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid KRAS G12V und ABHD12 V240M.	115
Abbildung 15 Klonverteilung der CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit den Peptiden SPOP D130Y und URB1 V1294I.	116
Abbildung 16 Klonverteilung der CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem Peptid RBM5 D86G.	117
Abbildung 17 Klonverteilung der CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit den Peptiden ABI1 G15R, MLXIP C521Y und PLA2G6 N601Y.....	118
Abbildung 18 FACS-Analyse der TCR-Expression vor und nach der Selektion mittels Tyto-Sortierung.....	123

Abbildung 19 Aktivierung gecrispter TCR-T-Zellen (AR P4-4/P5-7) nach Kokultur mit Peptid-beladenen MCF-7-Zellen.	125
Abbildung 20 Tetramerfärbung zur Validierung der Peptidbindung durch den TCR AR P4-4/P5-7.	126
Abbildung 21 Experimenteller Aufbau zur funktionellen Überprüfung impfinduzierter TCRs in München.	128
Abbildung 22 Funktionelle Aktivierung von Jurkat-Reporterzellen, die TCR 3 (KRAS G12V) exprimieren.....	130
Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402.....	132
Abbildung 24 Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf B-Zell-Blasten.....	136
Abbildung 25 Stimulationsindex der Multi-Zytokinantworten (ASI-MCR) unter verschiedenen Bedingungen der Blasten-Challenge.....	138
Abbildung 26 Exemplarische FACS-Plots zur Gating-Strategie im Immunomonitoring.	141
Abbildung 27 FACS-basierte Analyse der T-Zell-Reaktivität auf die Peptidvakzinierung (V15).....	143
Abbildung 28 Schematischer Aufbau des DNA-Templates zur Integration der TCR- α - und - β -Kette in den humanen TRAC-Lokus mittels homologiegesteuerter Rekombination (HDR).	185

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Polymorphismus ausgewählter HLA-Gene der Klasse-I- und -II-Moleküle.	36
Tabelle 2: Unkonjugierte Antikörper.....	69
Tabelle 3: Konjugierte Antikörper.....	69
Tabelle 4: Immunomonitoringpanel.....	70
Tabelle 5 Übersicht der Patientinnen und Patienten der IVAC-ALL-1-Studie.	84
Tabelle 6 Verwendete CDR3-Sequenzen für die Konstruktion transgener TCRs im Rahmen der OTR-Experimente.....	96
Tabelle 8 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit ZCCHC3 D269fs.	107
Tabelle 9 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit FGL1 T279A.....	108
Tabelle 10 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit FGL1 T279A.....	108
Tabelle 11 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit L3MBTL4 M188I.	109
Tabelle 12 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0106 nach Stimulation mit SP100 F712L.	109
Tabelle 13 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem ASAP3 A111V (Zeitpunkt V7).	110
Tabelle 14 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V (Zeitpunkt V7).....	111
Tabelle 15 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V (Zeitpunkt V17).....	111
Tabelle 16 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid CIC A320S (Zeitpunkt V17).	112
Tabelle 17 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid CIC A320S (Zeitpunkt V10).	112
Tabelle 18 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit EXOC4 R574P (Zeitpunkt V12).....	113
Tabelle 19 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P (Zeitpunkt V17).....	113
Tabelle 20 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P (Zeitpunkt V17).....	113
Tabelle 21 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit dem Peptid AEBP1 R854P.....	114

Tabelle 22 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit SORL1 C1403G.....	114
Tabelle 23 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid KRAS G12V.	115
Tabelle 24 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid ABHD12 V240M.....	115
Tabelle 25 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem Peptid SPOP D130Y.	116
Tabelle 26 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem Peptid SPOP D130Y.	116
Tabelle 27 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem URB1 V1294I.....	117
Tabelle 28 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem Peptid RBM5 D86G (Zeitpunkt V7).....	117
Tabelle 29 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem RBM5 D86G (Zeitpunkt V10).	118
Tabelle 30 Häufigste TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid ABI1 G15R (Zeitpunkt V10).	118
Tabelle 31 TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid ABI1 G15R (Zeitpunkt V11).	119
Tabelle 32 TCR-Klone in CD8 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid MLXIP C521Y (Zeitpunkt V12).....	119
Tabelle 33 Häufigste TCR-Klone in CD4 ⁺ -T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid PLA2G6 N601Y (Zeitpunkt V17).	119
Tabelle 34 Verwendete Zelllinien zur funktionellen Testung der transgenen Jurkat-TPR-Zellen.....	124
Tabelle 35 Funktionelle Charakterisierung von TCR-Kandidaten aus der IVAC-ALL-1-Studie.	134
Tabelle 36 Peptid-Impf-Cocktail für Patient IVAC-RCC-001.....	140
Tabelle 37 Struktureller Aufbau des HDR-Templates für die CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration.....	184

Abkürzungsverzeichnis

ABHD12	<i>α/β-Hydrolase domain-containing protein 12</i>
AEBP1	<i>Adipocyte enhancer-binding protein 1</i>
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	<i>Activator Protein-1</i> , Aktivierungsprotein 1 (Transkriptionsfaktor)
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
ASAP3	<i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3</i>
BAL	<i>Biphenotypic acute leukemia</i> ; biphänotypische akute Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C-ALL	<i>Common acute lymphoblastic leukemia</i> ; häufige Form der akuten lymphatischen Leukämie
CAR-T-Zelle	<i>Chimeric-antigen receptor modified T cell</i> , chimärer Antigenrezeptor-modifizierte T Zelle
Cas	<i>CRISPR-associated</i> , CRISPR-assoziiertes Protein
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CIC	<i>Capicua transcriptional repressor</i>
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
ddH ₂ O	<i>Double-distilled water</i> , demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	<i>Desoxynucleotid-Triphosphate</i>
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline

E:T	<i>Effector to target ratio</i> , Effektor-zu-Zielzellverhältnis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EXOC4	<i>Exocyst complex component 4</i>
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , <i>Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGL1	<i>Fibrinogen-like protein 1</i>
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung
g	Gramm
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> , gute Herstellungspraxis
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
HDR	<i>Homology-directed repair</i> , homologiegesteuerte Reparatur
HLA-I	<i>Human leukocyte antigen class I</i> , humanes Leukozytenantigen Klasse I
ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> , intrazelluläre Zytokinfärbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> , Interferon-regulierender Transkriptionsfaktor
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> , Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv von Immunrezeptoren
IU	<i>International Unit</i> , Internationale Einheit
JTPR	Jurkat Triple Parameter Reporter
KI	<i>Knock-in</i>
KM-MNC	Mononukleäre Zellen des Knochenmarks
KO	<i>Knock-out</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
l	Liter

L3MBTL4	<i>Lethal(3) malignant brain tumor-like protein 4</i>
M	Mol
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
MLL ⁺	<i>mixed lineage leukemia gene rearrangement</i> (KMT2A); Umlagerung des MLL-Gens (KMT2A)
mM	Millimol
mm	Millimeter
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> , nukleärer Faktor κB
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i> , nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
nM	Nanomol
OTR	<i>Orthotopic TCR Replacement</i> , orthotoper TCR Austausch
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PLA2G6	<i>Phospholipase A2 group VI</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pre B-ALL	<i>pre-B cell acute lymphoblastic leukemia</i> ; prä-B-Zell akute lymphatische Leukämie
pro-B-ALL	<i>pro-B cell acute lymphoblastic leukemia</i> ; pro-B-Zell akute lymphatische Leukämie
RBM5	<i>RNA binding motif protein 5</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleinprotein

SI	Stimulationsindex
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SORL1	<i>Sortilin-related receptor 1</i>
SP100	<i>SP100 nuclear antigen</i>
SPOP	<i>Speckle-type POZ protein</i>
SSC	<i>Side Scatter</i> , Seitwärtsstreuung
T-ALL	<i>T cell acute lymphoblastic leukemia</i> ; T-Zell akute lymphatische Leukämie
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TRAC	<i>T Cell receptor alpha constant</i> , T-Zell-Rezeptor Alpha-Kette konstante Region
TRAJ	<i>T Cell receptor alpha joining</i> , T-Zell-Rezeptor Alpha-Kette Joining-Segment
TRAV	<i>T cell receptor alpha variable</i> , T-Zell-Rezeptor Alpha-Kette variable Region
TRBC	<i>T cell receptor beta constant</i> , T-Zell-Rezeptor Beta-Kette konstante Region
TRBV	<i>T cell receptor beta variable</i> , T-Zell-Rezeptor Beta-Kette variable Region
URB1	<i>URB1 ribosome biogenesis 1 homolog</i>
x g	Mittlere Erdschwerebeschleunigung
ZCCHC3	<i>Zinc finger CCHC-type containing 3</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

Zusammenfassung

Die personalisierte Peptidvakzinierung gilt als vielversprechender immuntherapeutischer Ansatz zur gezielten Aktivierung tumorspezifischer T-Zellantworten. Im Gegensatz zu konventionellen, nicht individualisierten standardisierten Therapiekonzepten ermöglicht sie eine patientenindividuelle Immunisierung gegen mutierte, tumorspezifische Antigene (Neoantigene) und bildet damit die rationale Grundlage für eine spezifische, auf das individuelle Tumorantigenprofil angestimmte Immuntherapie. Ihre Wirksamkeit hängt jedoch entscheidend von der Funktionalität und Spezifität der durch Impfung induzierten T-Zellen ab, da nur funktionell kompetente und spezifische T-Zellen zur gezielten Elimination tumoraler Zellen beitragen können. Die Identifikation und Validierung entsprechender T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCRs) ist daher eine zentrale Voraussetzung für die Weiterentwicklung TCR-basierter Zelltherapien und für die präzise Beurteilung der Immunantworten im Rahmen klinischer Impfstudien.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der personalisierten, neoantigenbasierten Peptidvakzinierungsstudie IVAC-ALL-1 impfstoffinduzierte TCRs aus dem peripheren Blut von Patientinnen und Patienten zu identifizieren, funktionell zu charakterisieren und ein molekulares Validierungssystem für deren präklinische Testung zu etablieren. Hierzu wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) nach *ex vivo* Stimulation mit Impfpeptiden auf ihre Antigenspezifität hin untersucht, und reaktive T-Zellen über die Expression von CD154 beziehungsweise IFN γ angereichert und sortiert. Mittels Einzelzell-TCR-Sequenzierung konnten multiple Kandidaten identifiziert werden. Diese TCR-Sequenzen wurden in ein CRISPR-Cas9-basiertes System zum orthotopen TCR-Austausch (*orthotopic TCR replacement*, OTR) überführt, um eine funktionelle Validierung in modifizierten Zielzellen zu ermöglichen.

Die zugrunde liegende OTR-Technologie wurde in enger Kooperation mit München etabliert, erfolgreich in Tübingen implementiert und an die lokalen Anforderungen angepasst. Sie bildet die methodische Grundlage für weiterführende präklinische Validierungsansätze, insbesondere in primären T-Zellen. Die resultierenden transgenen T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber peptidbeladenen Zielzellen funktionell getestet. Hierbei kamen sowohl HLA-kompatible Zelllinien als auch autologe beziehungsweise allogene B-Zell-Blasten zum Einsatz, um die Antigenerkennung unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. In einem Einzelfall konnte darüber

hinaus eine *Blasten-Challenge* mit Patientenmaterial aus einem individuellen Heilversuch durchgeführt werden, bei der eine Aktivierung der T-Zellen nach Peptidbeladung der Blasten nachgewiesen wurde.

Zur weiteren Validierung wurden ausgewählte TCRs in J-TPR-Zellen exprimiert – einem fluoreszenzmarkierten Reporterzellmodell auf Jurkat-Basis, das die Signaltransduktion über die Transkriptionsfaktoren NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und AP-1 (*activator protein-1*) abbildet. Damit konnte für mehrere TCRs eine klare und spezifische Aktivierung bei Kontakt mit dem jeweiligen Impfpeptid gezeigt werden. Ergänzend wurde in einem Fall eine Peptid-Tetramerfärbung zur Bestätigung der Peptidbindung durchgeführt. Der zugrunde liegende TCR stammte aus einer geimpften Patientin mit Nierenzellkarzinom, deren peripher entnommene T-Zellen nach antigenspezifischer Expansion und Sequenzierung analysiert worden waren. Einer der daraus identifizierten TCRs wurde mittels OTR in J-TPR-Zellen eingebracht und zeigte in der funktionellen Reporteranalyse eine peptidspezifische Aktivierung. Die anschließende Tetramerfärbung bestätigte zusätzlich die spezifische Bindung des TCRs an den entsprechenden Peptid-HLA-Komplex und unterstützte somit die funktionellen Ergebnisse.

Andere TCR-Kandidaten zeigten hingegen keine funktionelle Antwort auf das Zielpeptid oder reagierten auf nicht mit Peptid beladene Zielzellen. In diesen Fällen war entweder keine ausreichende Aktivierung nachweisbar oder es zeigte sich eine unerwünschte Reaktivität, deren Ursachen in peptidunspezifischen Effekten, potenzieller Kreuzreaktivität oder den Grenzen der verwendeten Testsysteme liegen könnten. Zugleich ist zu berücksichtigen, dass ein Teil der analysierten T-Zellen aus Patientinnen und Patienten stammte, die im Rahmen der IVAC-ALL-1-Studie geimpft worden waren und sich nach intensiver Vorbehandlung in stabiler Remission befanden. Klinisch zeigten sich bei diesen Personen keine Hinweise auf Autoimmunreaktionen oder impfassozierte Toxizität. Eine Reaktivität gegenüber nicht beladenen Blasten muss daher nicht zwingend als pathologisch bewertet werden, sondern könnte im Einzelfall auch eine immunologische Relevanz besitzen – etwa im Sinne eines potenziellen Graft-versus-Leukemia-Effekts. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Bedeutung einer kontextualisierten funktionellen Testung und unterstreichen die Notwendigkeit, Sicherheitsbewertungen nicht allein auf vereinfachte *in vitro*-Modelle zu stützen, sondern durch funktionelle Validierung in patientennahen Systemen zu ergänzen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methodik erlaubt eine umfassende Analyse impfstoffinduzierter T-Zellantworten auf molekularer Ebene. Durch die Kombination

aus Einzelzellsequenzierung, funktioneller Testung in nativen und modifizierten Zielzellmodellen sowie der Anwendung der OTR-Technologie wurde ein translationales nutzbares Validierungssystem für TCR-Kandidaten geschaffen. Dieses Vorgehen kann langfristig dazu beitragen, TCRs mit hoher Spezifität und funktioneller Eignung für klinische Anwendungen zu identifizieren, zu charakterisieren und gezielt auszuwählen.

Darüber hinaus liefern die gewonnenen Daten wertvolle Hinweise zur immunologischen Relevanz einzelner Impfpeptide. Eine systematische Auswertung funktioneller TCR-Eigenschaften könnte künftig dazu beitragen, Kriterien für die Priorisierung von Peptiden weiter zu schärfen und in die Priorisierung innerhalb personalisierter Vakzindesigns zu integrieren. Damit leistet diese Arbeit nicht nur einen Beitrag zur Weiterentwicklung individualisierter, TCR-basierter Immuntherapien, sondern auch zur verbesserten Steuerung personalisierter Vakzinierungsstrategien.

Die Verbindung aus patientennaher Immunantwortanalyse und molekularer Testplattform unterstreicht den translationalen Charakter dieser Arbeit und eröffnet Perspektiven für die klinische Anwendung funktionell charakterisierter, tumorspezifischer TCRs.

1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Relevanz der Arbeit

Trotz medizinischer Fortschritte stellen maligne Erkrankungen weiterhin eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin dar [6]. Trotz erheblicher Fortschritte in der Früherkennung und der Entwicklung multimodaler Therapiekonzepte ist die Prognose vieler Tumorerkrankungen, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium, weiterhin limitiert. Klassische Behandlungsansätze wie Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie sind oft mit schweren Nebenwirkungen assoziiert und bieten in vielen Fällen keine langfristige Kontrolle der Erkrankung. Vor diesem Hintergrund hat sich die Immuntherapie in den letzten zwei Jahrzehnten als vierte Säule der Krebsbehandlung etabliert [7, 8].

Ziel der Immuntherapie ist es, die Fähigkeit des Immunsystems zur Erkennung und Eliminierung maligner Zellen gezielt zu nutzen oder zu reaktivieren. Anders als bei chemotherapeutischen Ansätzen, die vorrangig unspezifisch proliferierende Zellen angreifen, zeichnet sich die Immuntherapie durch ihre hohe Spezifität gegenüber Tumorzellen und ihre potenziell langanhaltende Wirkung aus [9-11]. Besonders die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen gilt als vielversprechender Ansatz, da T-Zellen in der Lage sind, intrazelluläre Tumorantigene im Kontext von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) zu erkennen und zielgerichtet zu eliminieren [12, 13].

Die Grundlage dieser Immunantwort ist die funktionelle Spezialisierung des adaptiven Immunsystems. T-Zellen erkennen Peptidfragmente, die auf MHC-Klasse-I- oder -II-Molekülen präsentiert werden. Die Bindung erfolgt über den TCR, dessen hohe Diversität durch somatische Rekombination der TCR-Genloci ermöglicht wird. Diese antigenspezifische Erkennung befähigt T-Zellen, gezielt auf pathogene oder transformierte Zellen zu reagieren – vorausgesetzt, das Antigen wird als „nicht-selbst“ erkannt [5, 14]

Die Herausforderung in der Tumorimmunologie besteht jedoch darin, dass Tumorzellen verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um sich der immunologischen Überwachung zu entziehen. Diese sogenannten Immunevasionsstrategien umfassen unter anderem die Herunterregulation von MHC-Molekülen, die Sekretion immunsuppressiver Zytokine sowie die Expression inhibitorischer Checkpoint-Moleküle wie PD-L1 [15, 16]. Dadurch bleibt die

tumorspezifische Immunantwort oft ineffektiv, was die Notwendigkeit gezielter immuntherapeutischer Strategien unterstreicht.

Ein vielversprechender Ansatz ist die gezielte Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen durch die Identifikation sogenannter Neoantigene. Diese entstehen durch somatische Mutationen im Tumor und führen zu neuartigen Peptidsequenzen, die ausschließlich in Tumorzellen vorkommen und nicht im normalen Gewebe exprimiert werden. Dadurch besitzen sie ein hohes immunogenes Potenzial, ohne gleichzeitig autoreaktive Reaktionen auszulösen [17-19]. Neoantigene gelten daher als ideale Zielstrukturen für personalisierte Immuntherapien, insbesondere im Rahmen von Peptidvakzinierungen oder TCR-basierten Zelltherapien.

Die Entwicklung solcher Neoantigen-spezifischer Therapien basiert auf der systematischen Identifikation patientenspezifischer Mutationen durch Hochdurchsatz-Sequenzierung, gefolgt von bioinformatischer Antigenvorhersage und funktioneller Validierung. Diese Strategie bildet die Grundlage für individualisierte Impfprogramme wie die IVAC-Studien (Individuelle Vakzinierung gegen Krebs), in deren Rahmen tumorspezifische Peptide auf Basis des Tumorgenoms jedes Patienten identifiziert und für die Immuntherapie genutzt werden [20-22].

Die vorliegende Arbeit baut auf diesen Konzepten auf und untersucht die funktionelle Charakterisierung tumorspezifischer T-Zell-Rezeptoren, die im Rahmen der personalisierten Peptidvakzinierungsstudie IVAC-ALL-1 aus dem peripheren Blut geimpfter Patientinnen und Patienten gewonnen wurden. Im Mittelpunkt steht die Frage, inwieweit durch Vakzinierung tumorspezifische T-Zellen mit definierter Antigenspezifität aktiviert werden können und wie diese TCRs hinsichtlich Funktionalität, Antigenbindung und potenzieller Kreuzreaktivität zu bewerten sind. Neben der Analyse der klonalen Zusammensetzung und Antigenspezifität liegt ein methodischer Schwerpunkt auf dem Einsatz des orthotopen TCR-Austausches in einem standardisierten reporterbasierten Testsystem [23], das die funktionelle Validierung einzelner TCR-Kandidaten ermöglicht. Die hier gewonnenen Daten sollen einen Beitrag zur Weiterentwicklung personalisierter T-Zell-Therapien leisten und mögliche Kriterien zur sicheren Selektion tumorspezifischer TCRs für zukünftige klinische Anwendungen definieren.

1.1 Immunologische Grundlagen: Aufbau und Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem bildet eine essenzielle Verteidigungslinie des Körpers gegenüber pathogenen Mikroorganismen, entarteten körpereigenen Zellen sowie körperfremden oder immunologisch relevanten Substanzen [24]. Es besteht aus einem fein abgestimmten Zusammenspiel zellulärer und humoraler Komponenten, das sowohl angeborene als auch adaptive Mechanismen umfasst. Im Verlauf der Evolution hat sich aus einfachen Schutzsystemen ein komplexes Netzwerk entwickelt, das eine präzise Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ ermöglicht [25, 26].

Die Immunabwehr lässt sich funktionell in zwei Hauptkomponenten unterteilen: das angeborene (*innate*) und das adaptive Immunsystem [27, 28]. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere dar und reagiert rasch auf konservierte, pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt werden und eine evolutionär fixierte Erkennungstrategie repräsentieren [29, 30]. Diese Mechanismen werden maßgeblich durch Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen vermittelt [31, 32].

Im Gegensatz dazu ist das adaptive Immunsystem in der Lage, eine hochspezifische und langfristige Immunantwort aufzubauen. Es basiert auf B- und T-Lymphozyten, deren Antigenrezeptoren durch somatische Rekombination eine enorme Diversität aufweisen [14]. Durch klonale Expansion und Gedächtnisbildung kann das adaptive Immunsystem gezielt und effizient auf eine Vielzahl potenzieller Bedrohungen reagieren und dadurch unter anderem Reinfektionen rascher bekämpfen [33].

Die enge funktionelle Verzahnung beider Systeme ist entscheidend für eine effektive Immunantwort. Dabei aktiviert das angeborene Immunsystem über Zytokine und Ko-Stimulationssignale die adaptive Immunität, während T-Helferzellen wiederum die Effektorfunktion angeborener Zellen wie Makrophagen modulieren können. Diese bidirektionale Kommunikation ist besonders relevant für die Immunüberwachung maligner Zellen und bildet die Grundlage moderner Immuntherapien [8, 9].

Im Folgenden werden die zentralen Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Blick auf ihre Relevanz für die Tumorummunologie dargestellt.

1.1.1 Evolution und Grundprinzipien der Immunabwehr

Die Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ zu unterscheiden, ist ein fundamentaler Bestandteil der Immunabwehr und hat sich über Jahrmillionen evolutionär entwickelt. Sie bildet die Voraussetzung für eine zielgerichtete, aber zugleich kontrollierte Immunantwort. Sie gewährleistet nicht nur die effektive Erkennung externer Bedrohungen, sondern auch die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Bereits einfache mehrzellige Organismen verfügen über molekulare Schutzmechanismen, die auf der Erkennung konservierter Pathogenstrukturen beruhen. So besitzen beispielsweise Schwämme primitive Immunrezeptoren, die strukturell als evolutionäre Vorläufer heutiger *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) gelten [34].

In wirbellosen Tieren dominieren zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems. Diese umfassen Phagozyten, antimikrobielle Peptide sowie Lektine, die Pathogene durch Mustererkennung erkennen und eliminieren können [35]. Die adaptive Immunität mit spezifischen Antigenrezeptoren ist hingegen eine evolutionäre Neuerung der Kiefernäuler (Gnathostomata) und findet sich erstmals bei Knorpelfischen wie Haien und Rochen [36]. Dieses System basiert auf der somatischen Rekombination von Gensegmenten zur Erzeugung hochdiverser B- und T-Zell-Rezeptoren [14].

Ein zentrales Prinzip der Immunabwehr ist die koordinierte Zusammenarbeit von angeborenem und adaptivem Immunsystem. Während das angeborene System rasch reagiert und über PRRs wie TLRs, NOD-like-Rezeptoren (NLRs) oder RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs) konservierte Pathogenmuster detektiert, vermittelt das adaptive System eine verzögerte, aber hochspezifische Reaktion durch klonale Expansion und Gedächtnisbildung [28, 31].

Die Antigenpräsentation ist ein wesentliches Bindeglied beider Systeme. Dendritische Zellen, die als professionelle antigenpräsentierende Zellen fungieren, nehmen Pathogene auf, prozessieren sie und präsentieren daraus entstandene Peptide über MHC-Moleküle an naive T-Zellen. Diese Interaktion ist essenziell für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems [37]. Die spezifische Erkennung dieser Peptide erfolgt über den TCR, der Peptide im Kontext von MHC-Molekülen erkennt und dadurch die antigenspezifische Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen ermöglicht.

Die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen beruht auf der hochspezifischen Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes durch den TCR. Dabei erkennt ein individueller TCR nicht das freie Peptid, sondern ausschließlich eine bestimmte

Kombination aus präsentierter Peptidsequenz und MHC-Molekül. Diese doppelte Spezifität — sowohl für die Aminosäureabfolge des Peptids als auch für das jeweilige HLA-Allel — stellt ein zentrales Prinzip der adaptiven Immunantwort dar. Bereits geringfügige Veränderungen in der Peptidstruktur oder eine Präsentation durch ein anderes HLA-Molekül können die Erkennung vollständig aufheben. Diese strikte Restriktion gewährleistet eine präzise Immunantwort, trägt aber gleichzeitig wesentlich zur interindividuellen Diversität bei. In therapeutischen Kontexten stellt sie eine besondere Herausforderung dar, da sowohl Peptid- als auch HLA-Kompatibilität berücksichtigt werden müssen — etwa bei der Entwicklung TCR-basierter Immuntherapien.

Zusammenfassend lässt sich die Immunabwehr als ein evolutionär entstandenes, hochvernetztes System beschreiben, das durch die Kombination unspezifischer und spezifischer Erkennungsmechanismen eine effektive Kontrolle von Infektionserregern und malignen Zellen ermöglicht. Die enge Verzahnung beider Systeme stellt die Grundlage für eine gezielte immuntherapeutische Intervention dar, wie sie in der modernen Immuntherapie Anwendung findet.

1.1.2 Das angeborene Immunsystem und seine Rolle in der Tumorimmunologie

Das angeborene Immunsystem stellt die evolutionär ältere Komponente der Immunabwehr dar und bildet die erste Linie der Verteidigung gegen pathogene Mikroorganismen und transformierter Zellen. Es zeichnet sich durch eine rasche, jedoch weitgehend unspezifische Reaktionsweise aus, die auf der Erkennung konservierter molekularer Muster beruht [29]. Seine zentralen Funktionen umfassen die physikalische Abschirmung potenzieller Erreger, die Initiierung von Entzündungsreaktionen, die Phagozytose und Lyse pathogener Organismen sowie die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Physikalisch-chemische Barrieren und lösliche Effektoren

Bereits epitheliale Grenzflächen wie Haut und Schleimhäute stellen effektive physikalische Barrieren gegen das Eindringen von Mikroorganismen dar. Keratinozyten der Epidermis synthetisieren antimikrobielle Peptide wie β -Defensine, Cathelicidine und RNase-7, welche bakterizid wirken und zusätzlich die chemotaktische Rekrutierung immunologischer Effektorzellen fördern [38-41]. In mukosalen Oberflächen tragen Schleim, sekretorisches IgA sowie lysozymhaltige Sekrete zur Neutralisierung inhalierter oder ingestierter Pathogene bei [42, 43].

Darüber hinaus spielt das Komplementsystem eine zentrale Rolle in der humoralen Komponente des angeborenen Immunsystems [44]. Die Aktivierung kann über den klassischen, den Lektin- oder den alternativen Weg erfolgen und führt zur Opsonisierung, zur direkten Lyse pathogener Zellen sowie zur chemotaktischen Aktivierung immunkompetenter Zellen [45]. Komplementfragmente wie C3a und C5a fungieren als Anaphylatoxine und verstärken die vaskuläre Permeabilität sowie die Infiltration von Leukozyten in entzündliche Gewebe [46].

Zelluläre Effektoren des angeborenen Immunsystems

Zu den zentralen zellulären Akteuren des angeborenen Immunsystems zählen neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Ihre Aktivierung erfolgt über PRRs, welche sowohl PAMPs als auch endogene Gefahrensignale in Form gewebeschadensassoziiertes molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) erkennen [28, 47].

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind die am besten charakterisierten PRRs. Sie erkennen extrazellulär oder endosomal lokalisierte mikrobielle Komponenten wie Lipopolysaccharide (TLR4), doppelsträngige RNA (TLR3) oder CpG-DNA (TLR9) [31]. Nach Ligandenbindung vermitteln TLRs über MyD88- oder TRIF-abhängige Signalwege die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und IRFs (*Interferon regulatory factor*), was zur Expression proinflammatorischer Zytokine, Typ-I-Interferone und kostimulatorischer Moleküle führt [30].

NOD-like-Rezeptoren (NLRs) detektieren zytosolische PAMPs oder zellulären Stress. Bestimmte NLRs wie NLRP3 sind in der Lage, Inflammasomen zu bilden – supramolekulare Komplexe, die die Aktivierung von Caspase-1 und die Reifung von IL-1 β und IL-18 vermitteln. Diese beiden Zytokine spielen als proinflammatorische Mediatoren eine zentrale Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung entzündlicher Immunreaktionen. [48, 49]. Durch diese Mechanismen trägt das angeborene System wesentlich zur Entstehung lokaler Entzündungsreaktionen bei.

Neutrophile Granulozyten sind als erste Effektorzellen am Infektionsort präsent. Sie eliminieren Mikroorganismen über Phagozytose, oxidative *Burst*-Reaktionen und die Freisetzung von neutrophilen extrazellulären Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs), die eine extrazelluläre Immobilisierung und Abtötung von Pathogenen ermöglichen [50].

Makrophagen sind phagozytische Zellen mit hoher Plastizität. Sie fungieren nicht nur als Effektorzellen in der Pathogenabwehr, sondern koordinieren auch die anschließende Gewebereparatur, Homöostase und die Auflösung von Entzündungen. Ihre funktionelle Polarisierung in proinflammatorische (M1) oder antiinflammatorische (M2) Subtypen wird durch das Zytokinmilieu reguliert – wobei M2-Makrophagen unter bestimmten Bedingungen eine immunsuppressive und proangiogene Rolle im Tumormikromilieu einnehmen können [51].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind lymphoide Zellen, die ohne vorherige Sensibilisierung zytotoxische Aktivität entfalten. Sie detektieren Zellen mit verminderter MHC-I-Expression („*missing self*“) oder verstärkter Expression von Stressliganden („*induced self*“) über ein fein austariertes Gleichgewicht inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren [52, 53] und sind deshalb besonders bedeutsam in der frühen Tumorabwehr und Viruselimination.

Dendritische Zellen – Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem

Eine Sonderstellung nehmen dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) ein. Sie erkennen Pathogene über PRRs, nehmen diese auf und prozessieren sie in endolysosomalen Kompartimenten. Anschließend präsentieren sie die generierten Peptide auf MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen, migrieren in sekundäre lymphatische Organe und aktivieren dort naive T-Zellen [37]. Die Fähigkeit zur sogenannten Kreuzpräsentation – der Präsentation exogener Antigene auf MHC-Klasse-I – befähigt bestimmte DC-Subtypen zur Aktivierung zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen gegen extrazelluläre Tumorantigene [54, 55].

Rolle des angeborenen Immunsystems in der Tumorummunologie

In der Tumorummunologie spielt das angeborene Immunsystem eine doppelte Rolle. Einerseits trägt es durch frühe Erkennung und Eliminierung transformierter Zellen zur Immunüberwachung bei. Andererseits können chronische Entzündung, M2-Makrophagen, myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) und toleranzinduzierende dendritische Zellen immunsuppressiv wirken und die Tumorprogression fördern [56, 57]. Diese funktionelle Ambivalenz – zwischen Tumor-*surveillance* und Tumorunterstützung – macht das angeborene Immunsystem zu einem zentralen Angriffspunkt moderner immuntherapeutischer Strategien. Das Verständnis dieser Balance ist entscheidend für die Entwicklung zielgerichteter Interventionen, die auf die Reprogrammierung des angeborenen Immunmechanismen abzielen – etwa durch den Einsatz von TLR-Agonisten zur Aktivierung dendritischer Zellen [58], STING-Agonisten zur

Induktion einer Typ-I-Interferon-vermittelten Immunantwort [59] oder durch gezielte Modulation myeloider Zellfunktionen wie der Reprogrammierung tumorassoziierter Makrophagen [60].

Während das angeborene Immunsystem mit schnelle, breit angelegten und evolutionär vorgeprägten Abwehrmechanismen eine erste Schutzbarriere gegen pathogene Bedrohungen bildet, ist für eine nachhaltige, hochspezifische und erinnerungsfähige Immunantwort das adaptive Immunsystem verantwortlich. Es ergänzt die angeborene Abwehr nicht nur funktionell, sondern wird maßgeblich durch sie aktiviert und gesteuert. Im folgenden Kapitel werden die zentralen Prinzipien, Zelltypen und Mechanismen des adaptiven Immunsystems im Detail dargestellt, mit besonderem Fokus auf die Differenzierung und Funktion von T-Lymphozyten – dem zentralen Effektorsystem vieler immuntherapeutischer Ansätze.

1.1.3 Das adaptive Immunsystem und seine funktionelle Spezialisierung

Das adaptive Immunsystem bildet die spezialisierte zweite Verteidigungslinie des Körpers. Es zeichnet sich durch eine hochspezifische Antigenerkennung, klonale Expansion und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Zentral für diese Funktion sind T- und B-Lymphozyten, deren Antigenrezeptoren durch somatische Rekombination eine enorme Diversität aufweisen [14]. Dies ermöglicht eine präzise Erkennung und Eliminierung pathogener oder transformierter Zellen. Anders als das angeborene System, das universelle Muster erkennt, reagiert das adaptive Immunsystem selektiv auf individuelle Antigenstrukturen und ist in der Lage, diese über Jahre hinweg immunologisch zu erinnern. Diese präzise und nachhaltige Immunantwort bildet auch die Grundlage für moderne immuntherapeutische Ansätze, in denen tumorspezifische T-Zellen gezielt aktiviert oder gentechnisch modifiziert werden.

Entwicklung und Selektion von T-Zellen

T-Lymphozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, durchlaufen ihre Reifung jedoch im Thymus wo sie eine strenge Selektion unterzogen werden [61]. Dort differenzieren sie zunächst zu doppelpositiven Vorläuferzellen, die sowohl CD4- als auch CD8-Korezeptoren exprimieren. In dieser Phase exprimieren sie erstmals funktionelle TCRs, deren Diversität durch somatische Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente in den α - und β -Ketten

generiert wird [62, 63]. Dieses stochastische Prinzip ermöglicht ein theoretisches Repertoire von über 10^7 unterschiedlichen TCRs und stellt sicher, dass T-Zellen prinzipiell in der Lage sind, jede mögliche Peptid-MHC-Kombination zu erkennen [64].

Um eine effektive, aber gleichzeitig selbsttolerante Immunantwort zu gewährleisten, durchlaufen Thymozyten eine strikte Selektion. In der positiven Selektion wird überprüft, ob der TCR die Fähigkeit besitzt, körpereigene MHC-Moleküle mit niedriger bis moderater Affinität zu erkennen. Nur Zellen, die MHC-Klasse-I- oder -II-Moleküle binden können, erhalten ein Überlebenssignal [65, 66]. Anschließend erfolgt die negative Selektion, bei der T-Zellen mit hoher Affinität zu körpereigenen Peptiden eliminiert werden, um die zentrale Immuntoleranz zu gewährleisten und die Entstehung autoreaktiver T-Zellen zu vermeiden [67, 68]

Reife, aber noch naive T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren durch den Organismus. Ihre Aktivierung erfolgt erst nach Kontakt mit einem spezifischen Antigen, das ihnen im Kontext passender MHC-Moleküle in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Milz präsentiert wird [69, 70]. Erst dann beginnen sie mit der klonalen Expansion und Differenzierung in Effektorzellen – ein zentrales Prinzip adaptiver Immunität, das auch in der T-Zell-basierten Immuntherapie gezielt genutzt wird.

Der T-Zell-Rezeptor und seine Signalweiterleitung

T-Zellen erkennen Antigene über den TCR, der als zentrales Erkennungsmolekül spezifisch Peptide im Kontext von MHC-Molekülen bindet. Der TCR ist ein heterodimeres Molekül, das aus einer α - und einer β -Kette besteht, deren variable Regionen gemeinsam die Antigenbindungsstelle formen. Diese Struktur erlaubt die hochspezifische Erkennung einzelner Peptid-MHC-Komplexe. Da die transmembranen und cytoplasmatischen Domänen des TCRs selbst nicht signaltransduktionsfähig sind, erfolgt die intrazelluläre Weiterleitung von Aktivierungssignalen über assoziierte CD3-Moleküle und die ζ -Ketten. Diese enthalten ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), die nach TCR-Stimulation phosphoryliert werden und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie NF- κ B, NFAT und AP-1 auslösen. Diese Signalwege steuern die Transkription immunrelevanter Gene, bilden die Grundlage für eine differenzierte T-Zellantwort und spielen eine zentrale Rolle in zahlreichen immunologischen Prozessen (siehe Abbildung 1 Struktur des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und intrazelluläre Signaltransduktion).

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus einer α - und einer β -Kette, die gemeinsam die Antigenerkennung im Kontext von MHC-Molekülen vermitteln. Da der TCR selbst keine Signalweiterleitung ermöglicht, ist er in einem multiproteinären Komplex mit den CD3-Molekülen (γ , δ , ϵ) sowie den ζ -Ketten assoziiert. Letztere enthalten immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), deren Phosphorylierung nach Antigenerkennung die intrazelluläre Signalweiterleitung und Aktivierung zentraler Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, NFAT und AP-1 initiiert. Quelle:[2].).

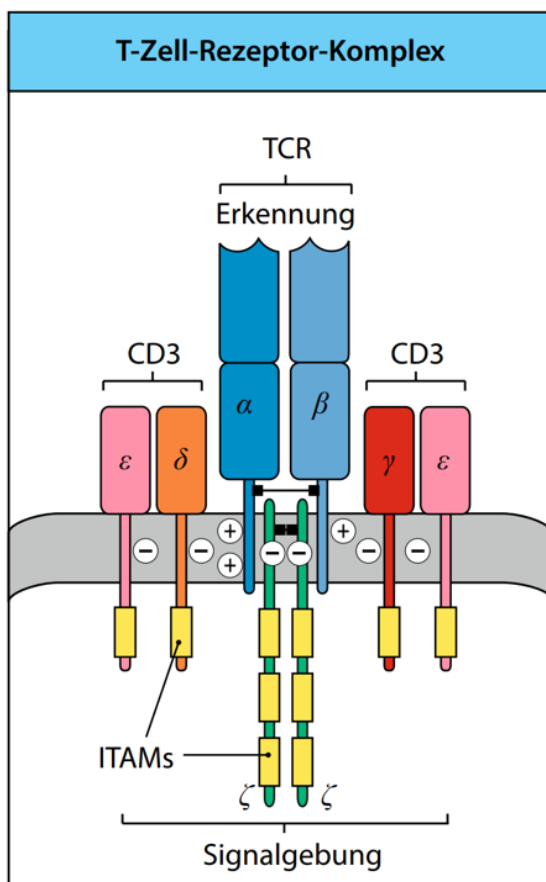


Abbildung 1 Struktur des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und intrazelluläre Signaltransduktion.

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus einer α - und einer β -Kette, die gemeinsam die Antigenerkennung im Kontext von MHC-Molekülen vermitteln. Da der TCR selbst keine Signalweiterleitung ermöglicht, ist er in einem multiproteinären Komplex mit den CD3-Molekülen (γ , δ , ϵ) sowie den ζ -Ketten assoziiert. Letztere enthalten immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), deren Phosphorylierung nach Antigenerkennung die intrazelluläre Signalweiterleitung und Aktivierung zentraler Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, NFAT und AP-1 initiiert. Quelle:[2].

NF- κ B reguliert vorrangig die Expression proinflammatorischer Zytokine und Überlebensfaktoren, während NFAT für die Transkription von IL-2 und weiteren Genen der T-Zell-Aktivierung essenziell ist. AP-1, ein heterodimerer Komplex aus Proteinen der Fos- und Jun-Familien, wirkt synergistisch mit NFAT und trägt zur Feinabstimmung aktivierungsabhängiger Genprogramme bei. Gemeinsam

orchestrieren diese Signalwege die Differenzierung, Proliferation und Effektorfunktion aktivierter T-Zellen.

Der TCR ist das zentrale Erkennungsmodul der T-Zelle und vermittelt die spezifische Antigenerkennung im Kontext von MHC-Molekülen. In der Mehrzahl der T-Zellen besteht er aus einer α - und einer β -Kette, die gemeinsam eine variable Bindungsdomäne formen und so eine hochspezifische Interaktion mit peptidbeladenen MHC-Klasse-I- oder -II-Molekülen ermöglichen [71, 72]. Die immense Diversität des TCR-Repertoires resultiert aus der somatischen Rekombination der V(D)J-Segmente in der frühen T-Zellentwicklung und ermöglicht die potenzielle Erkennung von Millionen unterschiedlicher Antigene.

Die bloße Bindung eines Peptid-MHC-Komplexes an den TCR reicht jedoch nicht aus, um eine vollständige T-Zell-Aktivierung von naiven T-Zellen bei Erstkontakt mit ihrem Antigen auszulösen [73]. Erst durch zusätzliche Signale – insbesondere die kostimulatorische Signalgebung – wird die T-Zelle funktionell aktiviert. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle mit CD80/CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle (*antigen-presenting cell*, APC), welche ein essenzielles zweites Signal liefert [74]. Fehlt diese Kostimulation, verbleibt die T-Zelle in einem anergischen Zustand und bleibt funktionell inert [75]. Nur nach einem optimalem TCR-Signal, differenziert sich die T-Zelle in spezifische Subtypen. Diese Differenzierung ist durch das vorherrschende Zytokinmilieu beeinflusst. Entsprechend der lokal sezernierten Zytokine entwickeln sich aus aktivierten CD4⁺-T-Zellen verschiedene T-Helfer-Subtypen (z. B. Th1-, Th2-, Th17- oder regulatorische T-Zellen [Treg]), während CD8⁺-T-Zellen in zytotoxische Effektorzellen übergehen. Diese Differenzierung wird durch die kombinierte Wirkung von TCR-Stimulation, Kostimulation und Zytokinsignalen orchestriert [72, 76].

Nach erfolgreicher Aktivierung proliferiert die T-Zelle im Rahmen der klonalen Expansion und generiert eine Vielzahl genetisch identischer Tochterzellen mit identischem TCR. Diese Effektorzellen sind in der Lage, infizierte oder maligne Zielzellen spezifisch zu erkennen und effizient zu eliminieren [77, 78].

CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen: Funktionelle Spezialisierung

T-Zellen lassen sich basierend auf ihrem Korezeptor in zwei Hauptpopulationen unterteilen: CD4⁺-T-Helferzellen (Th-Zellen) und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen (CTLs). CD4⁺-Zellen erkennen Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, und übernehmen eine zentrale Rolle in der Regulation und Koordination der Immunantwort. Abhängig vom Zytokinmilieu und der Art der

Antigenpräsentation differenzieren sie sich in verschiedene funktionelle Subtypen mit distinkten Aufgaben [79].

- **Th1-Zellen**, polarisiert durch IL-12, produzieren IFN γ , CD154 und TNF α . Sie fördern die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene und aktivieren Makrophagen [80, 81].
- **Th2-Zellen**, differenziert durch IL-4, sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13. Sie unterstützen die humorale Immunität und fördern die Antikörperproduktion durch B-Zellen [82-84]).
- **Th17-Zellen**, induziert durch IL-6 und TGF- β , sind durch die Sekretion von IL-17 und IL-22 charakterisiert. Sie sind essenziell für die Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze sowie an autoimmunen Entzündungsprozessen beteiligt [85, 86].
- **Tregs**, geprägt durch FOXP3-Expression und differenziert unter dem Einfluss von TGF- β und IL-2, regulieren die Immunantwort durch Suppression effektorischer Zellen. Sie sind essenziell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und verhindern Autoimmunität, unter anderem durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β [87-89].
- **Tfh-Zellen** (follikuläre T-Helferzellen), induziert durch Zytokine wie IL-6 und IL-21 und charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors BCL6, unterstützen B-Zellen im Keimzentrum durch die Produktion von IL-21 und IL-4. Sie fördern die Affinitätsreifung, den Klassenwechsel sowie die Selektion hochaffiner Antikörper-produzierender Zellen und sind damit zentral für die Etablierung einer effizienten humoralen Immunantwort [90, 91].

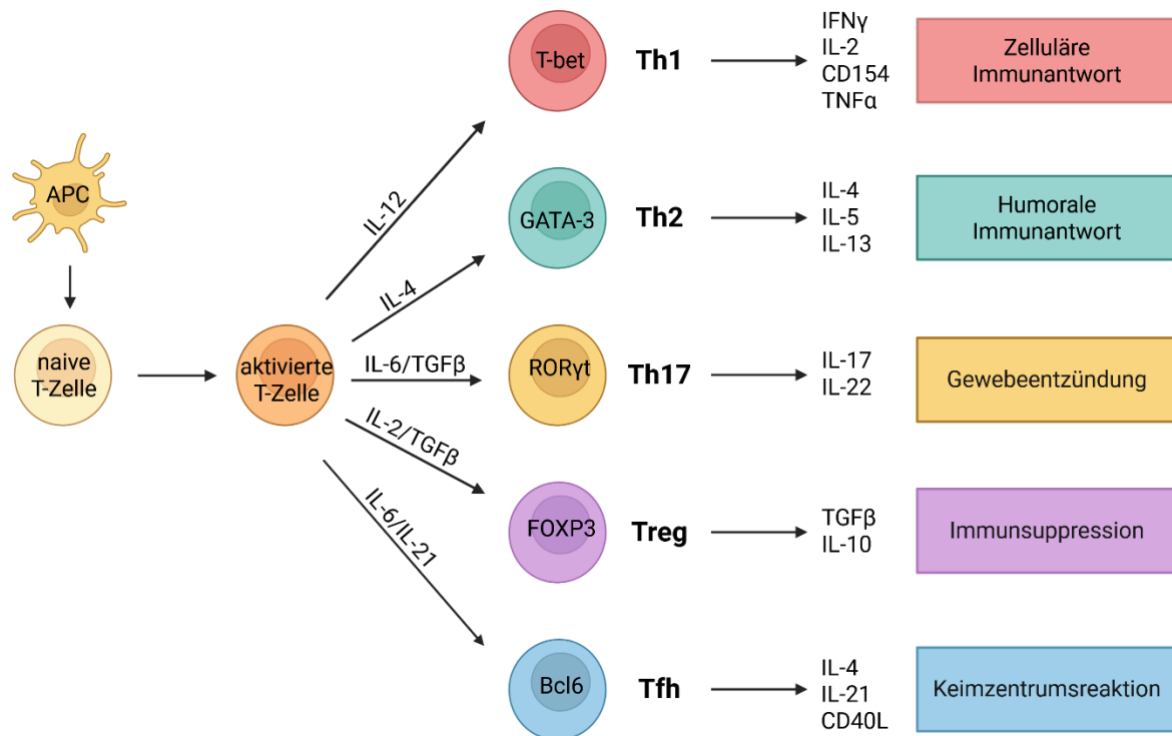


Abbildung 2 Differenzierung naiver CD4⁺-T-Zellen in funktionell spezialisierte Subtypen.

Nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation und in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu exprimieren CD4⁺-T-Zellen charakteristische Transkriptionsfaktoren und übernehmen distinkte immunologische Funktionen. IL-12 fördert die Entwicklung von Th1-Zellen, die den Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren und IFN γ , IL-2 und CD154 sezernieren. Sie vermitteln zelluläre Immunantworten gegen intrazelluläre Pathogene und Tumorzellen.

Th2-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-4, exprimieren GATA-3 und fördern durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 die humorale Immunität und die Unterstützung von B-Zellen.

Th17-Zellen, induziert durch IL-6 und TGF- β , exprimieren RORyt und sezernieren IL-17 und IL-22. Sie sind essenziell für die Vermittlung gewebebasierter Entzündungsreaktionen gegen extrazelluläre Pathogene.

Tregs entwickeln sich in Anwesenheit von TGF- β und IL-2, exprimieren FOXP3 und tragen durch die Sekretion von TGF β und IL-10 zur Immunsuppression und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bei.

Tfh-Zellen, differenziert durch IL-6 und IL-21, exprimieren Bcl6 und produzieren IL-4, IL-21 sowie CD40L, wodurch sie die Keimzentrumsreaktion und die Antikörperproduktion in B-Zellen unterstützen. Modifiziert nach Quelle [5].

Tregs entwickeln sich in Anwesenheit von TGF- β und IL-2, exprimieren FOXP3 und tragen durch die Sekretion von TGF β und IL-10 zur Immunsuppression und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bei.

Tfh-Zellen, differenziert durch IL-6 und IL-21, exprimieren Bcl6 und produzieren IL-4, IL-21 sowie CD40L, wodurch sie die Keimzentrumsreaktion und die Antikörperproduktion in B-Zellen unterstützen. Modifiziert nach Quelle [5].

CD8⁺-T-Zellen erkennen hingegen Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen [92]. Nach Aktivierung entwickeln sie eine zytotoxische Effektorphenotyp und eliminieren infizierte oder transformierte Zellen durch die Freisetzung von Perforin und Granzyme, was zur Einleitung der Apoptose der Zielzellen führt [93-95]. Diese Funktionen machen sie zu zentralen Effektoren in der antiviralen Abwehr sowie in der immunologischen Kontrolle von Tumorzellen.

Immunologische Gedächtnisbildung

Ein zentrales Merkmal des adaptiven Immunsystems ist die Fähigkeit zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das eine langanhaltende Schutzwirkung ermöglicht – sowohl nach natürlicher Infektion als auch nach Immunisierung. Dieses ermöglicht eine rasche und verstärkte Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt und bildet die Grundlage für den langfristigen Schutz durch natürliche Infektionen oder Impfungen. Nach einer erfolgreichen Primärantwort verbleibt ein Teil der aktivierten T-Zellen als Gedächtniszellen im Organismus [14].

Klassischerweise werden Gedächtnis-T-Zellen in zwei funktionelle Hauptpopulationen unterteilt: zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*memory T cells*, Tcm) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cells*, Tem) [96]. Tcm-Zellen zirkulieren bevorzugt durch sekundäre lymphatische Organe, weisen eine hohe Proliferationskapazität auf und sind in der Lage, bei erneuter Stimulation schnell eine Effektorzellantwort aufzubauen [97]. Tem-Zellen hingegen sind primär in peripheren Geweben lokalisiert und können bei Antigenkontakt sofort zytotoxische oder proinflammatorische Effektorprogramme aktivieren [98]. Durch diese komplementären Eigenschaften gewährleisten Tcm- und Tem-Zellen gemeinsam eine effiziente Immunüberwachung in verschiedenen anatomischen Kompartimenten.

Die funktionelle Diversifizierung des Gedächtnisrepertoires gewährleistet eine effektive immunologische Überwachung sowohl im systemischen als auch im peripheren Kompartiment. Diese Prinzipien werden zunehmend auch in der Tumormunologie genutzt – etwa durch Impfstrategien, die langlebige tumorspezifische T-Zellen induzieren, oder durch adoptive Zelltherapien mit Gedächtnis-T-Zellen, die für eine nachhaltige Tumorkontrolle sorgen sollen.

Die Aktivierung naiver T-Zellen und die Ausbildung eines funktionellen Gedächtnisses setzen jedoch voraus, dass Antigene in geeigneter Form präsentiert werden. Dabei spielt das MHC-System eine zentrale Rolle: Es vermittelt die Erkennbarkeit Peptid-basierter Antigene für T-Zellen und bestimmt maßgeblich deren Spezifität und Funktion.

1.1.4 MHC-Moleküle, Antigenpräsentation und Immunevasion

Das MHC-System bildet die molekulare Grundlage der T-Zell-vermittelten Antigenerkennung und stellt damit eine essentielle Voraussetzung für die zelluläre Immunität dar. Es umfasst polymorphe Zelloberflächenproteine, die prozessierte Peptidfragmente präsentieren und damit die spezifische Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen ermöglichen. Im menschlichen Immunsystem werden MHC-Moleküle als humane Leukozytenantigene (*human leukocyte antigens*, HLA) bezeichnet [99, 100].

Ein zentrales Prinzip der T-Zell-Immunität ist die sogenannte MHC-Restriktion: Der TCR erkennt Antigene ausschließlich dann, wenn sie im Kontext eines passenden autologen MHC-Moleküls präsentiert werden [101]. Dieses Prinzip stellt sicher, dass nur Zellen mit potenziell gefährlichem Inhalt – etwa durch Infektion oder maligne Transformation – gezielt erkannt und eliminiert werden können.

MHC-Klasse-I-Moleküle und Präsentation endogener Antigene

MHC-Klasse-I-Moleküle werden konstitutiv von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren endogen synthetisierte Antigene – etwa zytosolische Proteine oder Peptide aus viral transformierten oder mutierten zelleigenen Proteinen – an CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Dadurch ermöglichen sie die gezielte Erkennung und Eliminierung infizierter oder maligner Zellen durch das Immunsystem.

Die Prozessierung beginnt mit der proteasomalen Degradation intrazellulärer Proteine, wodurch Peptide mit einer typischen Länge von 8–11 Aminosäuren generiert werden [102, 103]. Diese werden anschließend über den Antigenpeptid-Transporter (*transporter associated with antigen processing*, TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert [104, 105]. Dort erfolgt die Beladung der MHC-I-Moleküle in einem Chaperon-vermittelten Prozess, der unter anderem durch Tapasin koordiniert wird [106, 107]. Nach erfolgreicher Beladung wird der MHC-I-Peptid-Komplex über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert, wo er von CD8⁺-T-Zellen erkannt werden kann [108]. Da viele Tumorantigene intrazellulären Ursprungs sind – z. B. Produkte somatischer Mutationen oder onkogener Signalwege – spielt die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation eine Schlüsselrolle in der Tumorummunologie und ist entscheidend für die Erkennung maligner Zellen durch CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten.

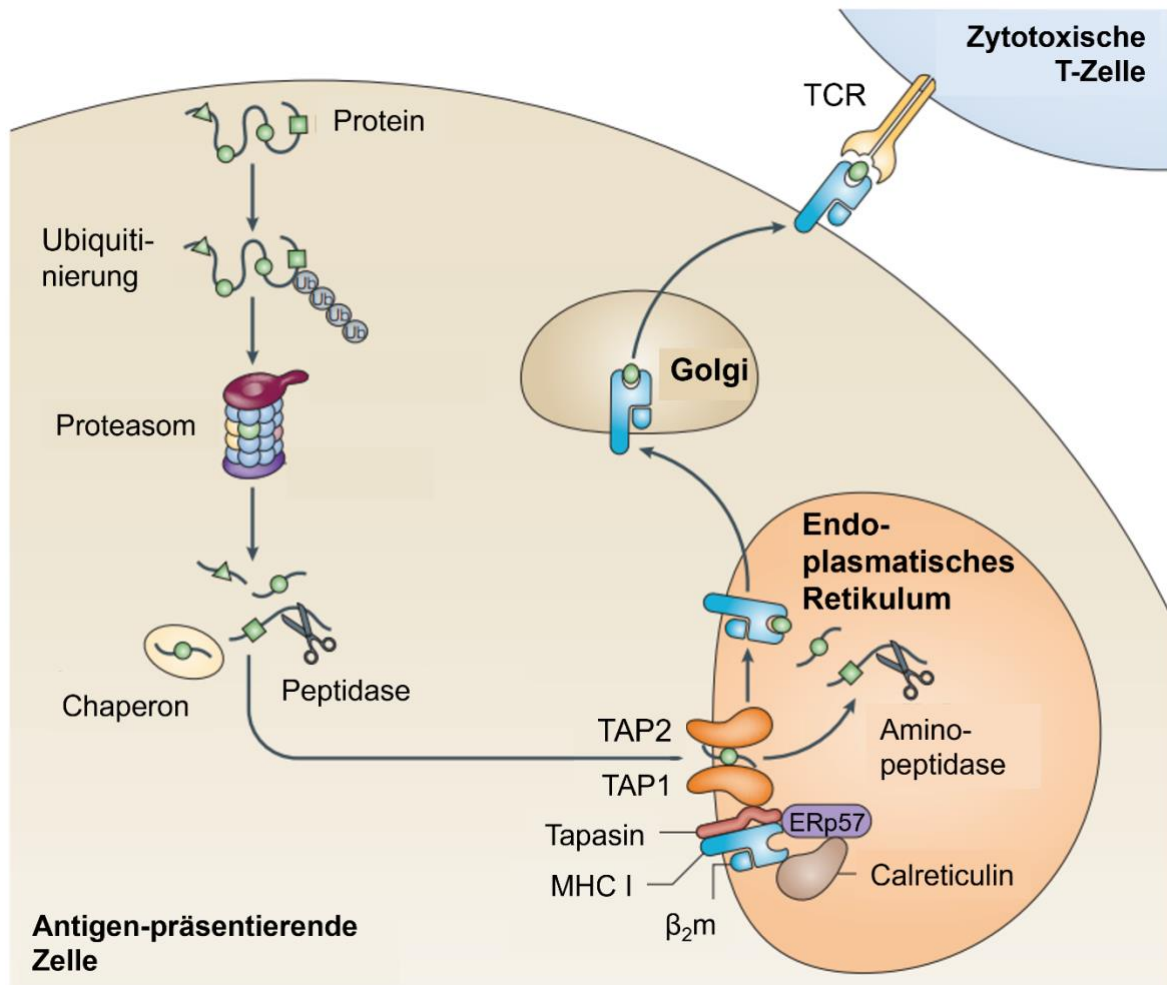


Abbildung 3 Prozessierung und Präsentation endogener Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle.

Intrazelluläre Proteine werden nach Ubiquitinierung durch das Proteasom in kleinere Fragmente zerlegt. Diese Peptide werden anschließend durch zytosolische Peptidasen weiterverarbeitet und mithilfe von Chaperonen stabilisiert. Über den Peptidtransporter TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), bestehend aus TAP1 und TAP2, gelangen die Peptide in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dort erfolgt die Beladung von MHC-I-Molekülen, vermittelt durch das Peptidbeladungskomplex aus Tapasin, Calreticulin und ERp57. Nach finaler Peptidbearbeitung durch ER-residente Aminopeptidasen wird der stabile MHC-I/Peptid-Komplex über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. An der Zelloberfläche präsentiert die antigenpräsentierende Zelle den Komplex dem T-Zell-Rezeptor (TCR) einer zytotoxischen CD8⁺-T-Zelle. Abgewandelt nach [4]

MHC-Klasse-II-Moleküle und Präsentation exogener Antigene

MHC-Klasse-II-Moleküle ermöglichen die Aktivierung CD4⁺-T-Zellen durch die Präsentation exogener Antigene auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen. Sie sind primär auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert [109]. Exogen aufgenommene Antigene werden von diesen Zellen prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4⁺-T-Helferzellen präsentiert, die dadurch zur zentralen Steuerung adaptiver Immunantworten befähigt werden. Die Antigenaufnahme erfolgt durch verschiedene endozytische

Mechanismen – darunter Phagozytose, Pinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose [110]. Nach der Aufnahme extrazellulärer Proteine in Endolysosomen werden diese durch saure Proteasen in Peptidfragmente zerlegt. In einem spezialisierten Kompartiment, dem sogenannten MHC-Klasse-II-Kompartiment (*MHC II compartment*, MIIC), liegt zu diesem Zeitpunkt häufig noch das Peptid CLIP (*Class II-associated invariant chain peptide*, deutsch: „Klasse-II-assoziiertes Peptid der invarianten Ketten“) in der Peptidbindungsstelle der MHC-Klasse-II-Moleküle vor. CLIP ist ein Restfragment der invarianten Kette, die während der Synthese an das MHC-II-Molekül gebunden war und dessen Peptidbindungsstelle blockierte. Im MIIC wird CLIP durch HLA-DM gegen prozessierte Antigene ausgetauscht, wodurch die Präsentation an der Zelloberfläche ermöglicht wird [111-113]. Der fertige MHC-Klasse-II-Komplex wird anschließend an die Zelloberfläche transportiert, wo er von CD4⁺-T-Zellen erkannt wird [114].

Die MHC-Klasse-II-vermittelte Präsentation ist insbesondere für die Aktivierung von Th-Zellen, die Unterstützung von B-Zellen bei der Antikörperproduktion sowie die Regulation von Makrophagenfunktionen zentral – und damit eine entscheidende Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität.

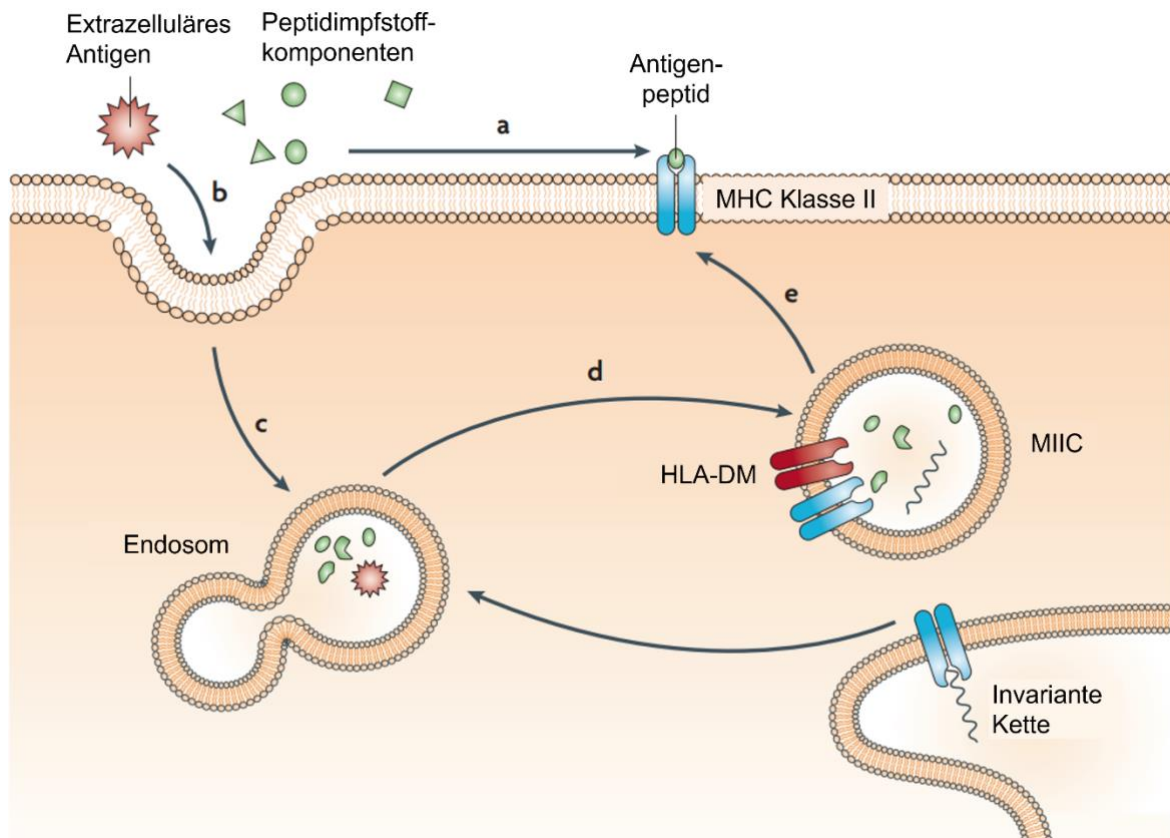


Abbildung 4 Antigenaufnahme und Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle.

Exogene Antigene – darunter auch Peptidimpfstoffkomponenten – werden durch endozytische Mechanismen (b) in antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und im Endosom (c) enzymatisch zu Peptidfragmenten prozessiert. Parallel werden MHC-Klasse-II-Moleküle unter Bildung eines Komplexes mit der invarianten Kette (Ii) im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und in das MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) transportiert. Dort ersetzt HLA-DM die CLIP-Sequenz durch prozessierte Antigenpeptide (d), bevor der beladene MHC-Klasse-II-Komplex an die Zelloberfläche transportiert wird (e) und dort von $CD4^+$ -T-Zellen erkannt werden kann (a). Abgewandelt nach [3]

Polymorphismus und funktionelle Bedeutung von HLA-Allelen

Die ungewöhnlich hohe genetische Diversität im HLA-System ist Ausdruck einer positiven Selektionskraft auf Populationsebene: Durch ausgleichende Selektion (*balancing selection*) bleibt eine Vielzahl funktioneller Allele erhalten, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Individuen innerhalb einer Population effektive Immunantworten gegen neu auftretende Pathogene entwickeln können.

Ein charakteristisches Merkmal des HLA-Systems ist sein ausgeprägter genetischer Polymorphismus, der sich in zahlreichen Allelvarianten an den MHC-Loci widerspiegelt. Diese Diversität hat direkte funktionelle Konsequenzen für die Peptidbindung und damit für die Qualität und Breite der präsentierten Antigenrepertoires. Unterschiedliche HLA-Allele binden Peptide mit variierender Affinität und Spezifität, was dazu führt, dass Individuen sich in ihrer Fähigkeit zur

Antigenerkennung erheblich unterscheiden können [115-117]. Damit trägt der HLA-Genotyp wesentlich zur interindividuellen Variation in der Immunantwort gegenüber Pathogenen und Tumorantigenen bei [118].

Auch im Kontext autoimmuner Erkrankungen spielt der HLA-Polymorphismus eine entscheidende Rolle. Bestimmte Allele sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert, da sie körpereigene Peptide so präsentieren können, dass autoreaktive T-Zellen aktiviert werden. Beispielhaft sind HLA-DR3 und DR-4, die mit einem erhöhten Risiko für Typ-1-Diabetes [119] sowie – im Fall von DR4 – auch mit rheumatoider Arthritis assoziiert sind [120]. Ein weiteres Beispiel ist HLA-B27, das stark mit ankylosierender Spondylitis assoziiert ist [121]. In diesen Fällen begünstigt die Peptidbindung durch bestimmte HLA-Moleküle eine fehlgeleitete Immunantwort, die zur immunvermittelten Gewebeschädigung führt.

Aus evolutionärer Perspektive stellt die hohe Diversität im HLA-System einen Selektionsvorteil dar: Sie erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest ein Teil der Population eine effektive Immunantwort gegen neu auftretende Erreger generieren kann [122]. Dieses Prinzip ausgleichender Selektion trägt somit wesentlich zur immunologischen Resilienz auf Bevölkerungsebene bei – insbesondere angesichts der ständigen Veränderung pathogener Herausforderungen [118].

Tabelle 1 Polymorphismus ausgewählter HLA-Gene der Klasse-I- und -II-Moleküle.

Anzahl bekannter Allelvarianten und kodierender Proteinsequenzen der wichtigsten klassischen HLA-Gene, basierend auf der IPD-IMGT/HLA-Datenbank (Stand: März 2025). Der hohe Polymorphismus insbesondere bei den Genen HLA-A, -B und -C spiegelt die enorme genetische Diversität wider, die für die individuelle Antigenpräsentation und die Qualität von zentraler Bedeutung ist.

HLA-Polymorphismus			
HLA-Gen	Genklasse	Anzahl Allele	Anzahl Proteine
HLA-A	Klasse-I	8.556	5.004
HLA-B		10.346	6.172
HLA-C		8.657	4.776
HLA-DRA	Klasse-II	78	17
HLA-DRB1		3.787	2.443
HLA-DQA1		872	448
HLA-DQB1		2.813	1.682
HLA-DPA1		765	373
HLA-DPB1		2.795	1.611

Kreuzpräsentation und immunologische Bedeutung

Ein immunologisch bedeutsamer Sonderfall der Antigenpräsentation ist die Kreuzpräsentation, bei der dendritische Zellen exogen aufgenommene Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren. Dieses einzigartige Phänomen ermöglicht die Aktivierung CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen gegen Antigene, die ursprünglich aus dem extrazellulären Raum stammen – etwa aus tumorösem Gewebe oder nicht infizierten, aber apoptotischen Zellen [123, 124]. Dadurch wird eine zytotoxische Immunantwort auch dann möglich, wenn keine direkte Infektion oder Transformation der antigenpräsentierenden Zelle vorliegt.

Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation ist insbesondere bei dendritischen Zellen ausgeprägt und spielt eine zentrale Rolle in der antiviralen sowie antitumoralen Immunität. Sie befähigt professionelle antigenpräsentierende Zellen dazu, tumorspezifische CD8⁺-T-Zellen zu aktivieren und somit eine effektive zelluläre Immunantwort einzuleiten [125]. In der Tumorimmunologie ist dieser Mechanismus von zentraler Bedeutung, da viele Tumorzellen selbst nur eingeschränkt zur Antigenpräsentation fähig sind. Die Fähigkeit professioneller APCs zur

sogenannten Kreuzpräsentation spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten.

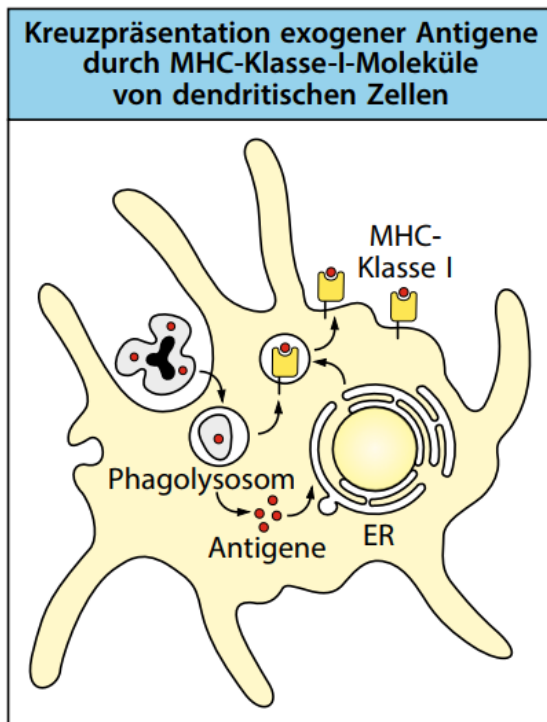


Abbildung 5 Kreuzpräsentation exogener Antigene durch dendritische Zellen.

Exogene Antigene werden durch Phagozytose aufgenommen und in einem Phagolysosom prozessiert. Im Rahmen der Kreuzpräsentation gelangen die prozessierten Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie in MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieser Mechanismus ermöglicht die Aktivierung CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen auch durch exogenes Antigen. Quelle: [2]

MHC-Restriktion und Immunevasion in der Tumorummunologie

Ein zentrales Prinzip der T-Zell-vermittelten Immunität, die sogenannte MHC-Restriktion, wird von Tumorzellen gezielt unterlaufen. Eine häufige Strategie ist die Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen, wodurch die Präsentation tumorspezifischer Peptide an CD8⁺-T-Zellen unterbunden wird [126, 127]. Zudem können Mutationen oder epigenetische Veränderungen in Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie auftreten – insbesondere im TAP-Transporter – wodurch der Peptidtransport ins endoplasmatische Retikulum und damit die MHC-I-Beladung beeinträchtigt wird [128]. TAP-defiziente Tumorzellen entziehen sich so der CD8⁺-T-Zell-Erkennung, sind jedoch potenziell Zielzellen für natürliche Killerzellen, die auf die Abwesenheit von MHC-Klasse-I reagieren („missing self“) [52, 129].

Neben strukturellen Veränderungen nutzen Tumore auch funktionelle Immunevasionsmechanismen, insbesondere durch die aktive Gestaltung eines immunsuppressiven Mikromilieus. Hierbei werden regulatorische T-Zellen (Tregs) und myeloide Suppressorzellen rekrutiert, die Zytokine wie TGF β und IL-10 sezernieren. Diese Faktoren hemmen die Reifung und Funktion dendritischer Zellen, was zu einer reduzierten Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Signalen auf antigenpräsentierenden Zellen führt – die effektive T-Zell-Aktivierung bleibt aus [56, 130]. Darüber hinaus tragen zusätzliche Suppressionsmechanismen wie die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) oder die Überexpression von Checkpoint-Molekülen (z. B. PD-L1) zur funktionellen Erschöpfung tumorspezifischer T-Zellen bei.

Diese Mechanismen ermöglichen dem Tumor ein Fortschreiten trotz vorhandener Immunreaktivität und stellen eine zentrale Hürde für die Wirksamkeit moderner Immuntherapien dar. Entsprechend gewinnen Strategien, die auf eine Wiederherstellung der MHC-Expression und Antigenpräsentation abzielen, oder eine funktionelle Inhibierung der T-Zellen reversieren, zunehmend an Bedeutung – etwa durch Checkpoint-Inhibition, epigenetische Modulatoren oder Kombinationstherapien, die multiple Immunfluchtmechanismen gleichzeitig adressieren [128].

Die Effektivität der adaptiven Immunantwort hängt maßgeblich von einer intakten MHC-vermittelten Antigenpräsentation und der darauffolgenden T-Zell-Aktivierung ab. Tumorzellen können jedoch gezielt in diese Prozesse eingreifen, um der immunologischen Erkennung zu entgehen – ein zentrales Hindernis für eine effektive Tumorkontrolle, das im folgenden Kapitel vertieft betrachtet wird.

1.2 Immunüberwachung und Immunevasion von Tumoren

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei der kontinuierlichen Überwachung und gezielten Eliminierung transformierter Zellen. Dieser Prozess wird als Immunüberwachung (*Cancer Immunosurveillance*) bezeichnet und beruht auf der Fähigkeit des angeborenen und adaptiven Immunsystems, tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene zu erkennen und gezielte Immunantworten auszulösen [7]. Zahlreiche präklinische und klinische Befunde belegen, dass CD8⁺-T-Zellen,

NK-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen aktiv an der Kontrolle der Tumorentstehung beteiligt sind.

Allerdings entwickeln Tumorzellen im Verlauf der malignen Transformation vielfältige Immunevasionsmechanismen (*Cancer Immune Escape*), mit denen sie der Erkennung und Eliminierung entgehen [7, 131].

Sie fördern nicht nur die Tumorprogression, sondern unterminieren auch die Effektivität therapeutischer Immuninterventionen – und stellen damit eine der größten Herausforderungen der modernen Tumorimmunologie dar [132].

1.2.1 Phasen der Immunüberwachung – das Immunoediting-Modell

Das Konzept der Immunüberwachung wurde im Immunoediting-Modell erweitert und präzisiert. Es beschreibt die dynamische Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem in drei funktionellen Phasen: *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape* [7]. Diese Stadien verdeutlichen, dass das Immunsystem nicht nur Tumorzellen eliminiert, sondern durch immunvermittelten Selektionsdruck auch deren Immunresistenz mitgestaltet.

Eliminationsphase (*Elimination*)

In der Eliminationsphase erkennt das Immunsystem entartete Zellen und eliminiert sie, bevor sie sich zu klinisch manifesten Tumoren entwickeln können. Dieser Prozess involviert sowohl angeborene als auch adaptive Immunmechanismen:

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) detektieren Tumorzellen über das Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen („*missing-self*“-Erkennung) oder durch Expression von Zellstress-assoziierten Rezeptoren und eliminieren diese durch Freisetzung zytotoxischer Granula [95, 133].

Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) erkennen tumorassoziierte Gefahrensignale und veränderte Zelloberflächenstrukturen und präsentieren daraufhin Antigene an T-Zellen, wodurch die adaptive Immunantwort eingeleitet wird [134].

Zusätzlich erkennen CD8⁺-zytotoxische T-Zellen tumorspezifische Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Nach Antigenerkennung setzen sie Perforin und Granzyme frei, wodurch Tumorzellen gezielt in die Apoptose getrieben

werden [94, 95]. CD4⁺-T-Helferzellen vom Typ Th1 unterstützen diese Immunantwort, indem sie entzündungsfördernde Zytokine wie IFN γ und TNF α sezernieren, die wiederum Makrophagen aktivieren und die Immunreaktion verstärken [135].

Gleichgewichtsphase (*Equilibrium*)

Wird nicht die gesamte Tumorzellpopulation in der Eliminationsphase zerstört, geht das System in die Phase des *Equilibrium*s über. Hier kontrolliert das Immunsystem das Tumorstadium zwar teilweise, vermag es jedoch nicht vollständig unterdrücken. Die verbleibenden Tumorzellen persistieren unter konstantem immunvermitteltem Selektionsdruck und können genetische oder epigenetische Veränderungen akkumulieren, die zu verringerter Immunogenität oder erhöhter Resistenz gegenüber Immunzellen führen [136].

Escape-Phase (*Escape*)

In der *Escape*-Phase gelingt es dem Tumor, die Immunüberwachung vollständig zu umgehen. Die immunresistenten Tumorzellen proliferieren unkontrolliert, was zur Entstehung klinisch manifester Tumoren führt [137]. Die zugrunde liegenden Immunevasionsmechanismen sind vielfältig:

- Herunterregulation oder Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen, sowie Manipulation der Antigenpräsentation, um der CD8⁺-T-Zell-Erkennung zu entgehen [127].
- Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie IL-10 und TGF- β , sowie Expression von immunmodulierenden Rezeptoren wie PD-L1, die sowohl T-Zellen als auch APCs in ihrer Funktion hemmen [130, 138].
- Rekrutierung immunsuppressiver Zellpopulationen, wie Tregs und MDSCs, die über lösliche Mediatoren oder direkte Zell-Zell-Interaktionen eine wirksame Hemmung der antitumoralen Immunantwort bewirken [138, 139].

In dieser Phase etabliert der Tumor ein immunsuppressives Mikromilieu, das durch multiple Mechanismen geprägt ist, die die Effektorfunktionen von T-Zellen blockieren und die Erkennung durch das Immunsystem weitgehend verhindern. Für Immuntherapien stellt dieser Zustand eine besondere Herausforderung dar, obwohl tumorspezifische T-Zellen vorhanden sind, jedoch funktionell gehemmt oder erschöpft sind. Hier setzen moderne immuntherapeutische Strategien an, die darauf abzielen, Immunblockaden zu überwinden und die Tumorüberwachung zu reaktivieren.

1.2.2 Immunevasionsstrategien von Tumoren

Tumoren bedienen sich einer Vielzahl von Strategien, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Diese Mechanismen ermöglichen es malignen Zellen, sich der Immunüberwachung zu entziehen, immunologische Kontrollmechanismen zu unterlaufen und eine tumorfreundliche Mikroumgebung aufzubauen. Sie betreffen sowohl strukturelle Komponenten – etwa MHC-Moleküle und die Antigenprozessierung – als auch regulatorische Ebenen wie das Mikromilieu und immunologische Checkpoint-Signale.

1.2.2.1 Herunterregulation von MHC-Molekülen

Ein zentraler Mechanismus der Tumor-Immunevasion ist die gezielte Herunterregulation der MHC-Klasse-I-Expression, wodurch die Präsentation tumorspezifischer Antigene an CD8⁺-T-Zellen verhindert wird [127, 140, 141]. Da zytotoxische T-Zellen Tumorzellen über Peptide erkennen, die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, führt ein Verlust dieser Moleküle zur funktionellen Unsichtbarkeit gegenüber der adaptiven Immunabwehr [7].

Ein häufiger Auslöser für die reduzierte MHC-I-Expression sind Mutationen oder funktionelle Defekte in der Antigenprozessierungsmaschinerie. Dazu gehören TAP1/2, das für den Transport von Peptiden in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist, sowie β 2-Mikroglobulin und Tapasin, die an der Stabilisierung und Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen beteiligt sind [107]. Fehlen diese Komponenten oder sind sie funktionell beeinträchtigt, werden Tumorantigene nicht effizient präsentiert – die betroffenen Zellen entziehen sich so der T-Zell-vermittelten Erkennung.

Allerdings kann das Immunsystem diesen Verlust kompensieren: Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) erkennen MHC-I-defiziente Zellen über das Prinzip des „*missing self*“ [52]. Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren binden normalerweise an MHC-Klasse-I-Moleküle und vermitteln dadurch ein Unterdrückungssignal. Fehlt dieses Signal – etwa infolge der Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen – entfällt die inhibitorische Kontrolle, sodass die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen freigesetzt wird, was zur Eliminierung der betroffenen Tumorzellen führen kann [133]. Um jedoch auch dieser Form der Immunüberwachung zu entgehen, exprimieren viele Tumorzellen zusätzlich nicht-klassische HLA-Moleküle wie HLA-G oder weitere immunsuppressive Liganden, die inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren (z. B. ILT2/ILT4 oder KIR2DL4) aktivieren und so eine erneute Hemmung der NK-Zellfunktion vermitteln [142, 143].

1.2.2.2 Induktion einer immunsuppressiven Mikroumgebung

Ein wesentlicher Mechanismus der Immunevasion ist die aktive Umprogrammierung der Tumormikroumgebung zu einer immunsuppressiven Nische, in der Effektorzellen in ihrer Funktion gehemmt und antitumorale Immunantworten unterdrückt werden. Zu den zentralen Akteuren dieser Immunmodulation zählen Tregs, MDSCs und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs).

Tregs unterdrücken die Funktion zytotoxischer T-Zellen und weiterer Effektorzellen durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β . Diese Zytokine dämpfen inflammatorische Signale und hemmen die Reifung und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen [138, 144].

Auch MDSCs tragen maßgeblich zur Immunsuppression im Tumormikromilieu bei. Sie hemmen die Proliferation von T-Zellen durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) sowie durch den Verbrauch von L-Arginin über Arginase oder iNOS, wodurch essentielle metabolische Voraussetzungen für die T-Zell-Aktivität entzogen werden [130, 138, 145]. TAMs, insbesondere im M2-polarisierten Zustand, fördern darüber hinaus nicht nur die Immunsuppression, sondern auch das Tumorwachstum. Durch die Sekretion vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und weiterer angiogener Mediatoren unterstützen sie die Neoangiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung [56, 57]. Die Polarisierung von M1- zu M2-Makrophagen wird wesentlich durch das Tumormikromilieu bestimmt und stellt einen zentralen Mechanismus der tumorunterstützenden Immunarchitektur dar.

1.2.2.3 Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen

Neben der Modulation der Mikroumgebung nutzen Tumorzellen inhibitorische Immun-Checkpoint-Signale, um T-Zellen gezielt in ihrer Funktion zu blockieren. Zwei der wichtigsten Mechanismen sind die PD-1xPD-L1 und CTLA-4xCD80/CD86 vermittelte Inhibition.

Immun-Checkpoint-Rezeptoren wie PD-1 oder CTLA-4 werden physiologischerweise nach Aktivierung von T-Zellen hochreguliert, um überschießende Immunreaktionen zu begrenzen und Autoimmunität sowie immunvermittelte Gewebeschädigungen zu verhindern. Dieses körpereigene Kontrollsystem wird jedoch von Tumorzellen gezielt ausgenutzt, indem sie entsprechende Liganden exprimieren und damit tumorspezifische T-Zellen funktionell hemmen.

Die Expression von PD-L1 (*programmed death ligand 1*) auf Tumorzellen erlaubt die Bindung an PD-1 (*programmed cell death protein 1*) auf aktivierten T-Zellen. Diese Interaktion hemmt TCR-vermittelte Signale, führt zur funktionellen Erschöpfung (*Exhaustion*) und Apoptose tumorspezifischer T-Zellen (Iwai et al., 2002; Dong et al., 2002; Keir et al., 2006). Die Folge ist eine selektive Inaktivierung tumorreaktiver T-Zellen im Tumormilieu – ein wesentlicher Mechanismus der Therapieresistenz [15, 16, 146].

CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4), ein kompetitiver Inhibitor von CD28, bindet mit höherer Affinität an CD80/CD86 auf APCs und blockiert so die kostimulatorische Aktivierung naiver T-Zellen [139, 147]. Dadurch wird die Proliferation unterdrückt und die Effektorfunktion limitiert.

Diese Checkpoint-Mechanismen stellen somit einerseits essenzielle Kontrollinstanzen der Immunhomöostase dar, werden andererseits aber von Tumoren gezielt genutzt, um T-Zell-vermittelte Immunantworten zu unterdrücken. Ihre therapeutische Blockade durch monoklonale Antikörper – z. B. gegen PD-1, PD-L1 oder CTLA-4 – bildet die Grundlage moderner Checkpoint-Inhibitor-Therapien, die darauf abzielen, funktionelle tumorspezifische T-Zellen zu reaktivieren [148, 149].

1.2.2.4 Tumor-induzierte Toleranzmechanismen

Über die direkte Suppression hinaus etablieren Tumoren auch langfristige Toleranzmechanismen, die eine antitumorale Immunantwort systematisch verhindern. Diese beruhen auf metabolischer Blockade, Apoptoseinduktion und antigenbezogener Immunselektion.

Ein zentraler Mechanismus ist die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), das den Tryptophan-Metabolismus beeinflusst. Der Tryptophanabbau durch IDO entzieht T-Zellen essenzielle Metaboliten und fördert gleichzeitig die Akkumulation immunsuppressiver Abbauprodukte wie Kynurenin, was zu T-Zell-Anergie und regulatorischer Differenzierung führt [150, 151].

Darüber hinaus exprimieren manche Tumoren Fas-Ligand (FasL), der über den Fas-(CD95)-Rezeptor auf tumorspezifischen T-Zellen die Apoptose dieser Effektorzellen auslöst. Dieses Prinzip der tumorinduzierten T-Zell-Depletion wurde in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet [34, 152].

Schließlich kann der Tumor durch klonale Selektion sogenannter Antigenverlust-Varianten der Immunerkennung entkommen. Dabei überleben Tumorzellen, die stark immunogene Antigene herunterregulieren oder verlieren –

z. B. durch epigenetische *Silencing*-Mechanismen oder Deletionen [141, 153]. Dieser Selektionsdruck führt zur Expansion tumorimmunresistenter Klone und stellt eine erhebliche Barriere für TCR-basierte Therapien dar.

Die genannten Toleranzmechanismen erschweren die Wirksamkeit immuntherapeutischer Ansätze erheblich. Entsprechend werden gezielte Strategien zur Hemmung von IDO, zur Blockade von FasL-Funktionen oder zur gezielten Ansprache subdominanter oder weniger immunogener Neoantigene zunehmend in der translationalen Forschung verfolgt.

1.2.3 Therapeutische Relevanz tumorassoziierter Immunevasionmechanismen

Die Fähigkeit von Tumorzellen, der immunologischen Erkennung und Eliminierung zu entgehen, stellt eine der zentralen Herausforderungen für die Entwicklung wirksamer Immuntherapien dar. Die Vielzahl molekularer und zellulärer Mechanismen, die zur Immunevasion beitragen, hat zur Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien geführt, die darauf abzielen, diese Barrieren zu überwinden und eine effektive antitumorale Immunantwort wiederherzustellen.

Ein wesentlicher Ansatz sind Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die inhibitorische Signale innerhalb der Immunantwort blockieren und erschöpfte tumorspezifische T-Zellen reaktivieren [154]. Hierzu zählen beispielsweise monoklonale Antikörper gegen PD-1, PD-L1 oder CTLA-4, die regulatorische Signalachsen hemmen, welche die Aktivierung und Funktion effektorischer T-Zellen einschränken und ermöglichen so die Wiederherstellung der Funktion tumorreaktiver T-Zellen [15, 16, 155].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die adoptive T-Zell-Therapie, bei der T-Zellen mit tumorspezifischen Rezeptoren gentechnisch modifiziert und *ex vivo* expandiert werden. Besonders CAR-T-Zellen und TCR-T-Zellen haben sich als effektive Strategien zur gezielten Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen erwiesen [156]. Während CAR-T-Zellen tumorspezifische Oberflächenantigene unabhängig von MHC erkennen, ermöglichen TCR-T-Zellen die Identifikation intrazellulärer Tumorantigene im Kontext autologer MHC-Moleküle [157, 158].

Beide Ansätze zeigen vielversprechende Ergebnisse, insbesondere bei hämatologischen Malignomen, stellen aber auch neue Herausforderungen im Hinblick auf Zielantigenselektion und Toxizitätsmanagement. Gerade bei soliden

Tumoren erweist sich die begrenzte Verfügbarkeit tumorspezifischer Antigene als zentrales Hindernis, da die meisten potenziellen Zielstrukturen auch auf gesundem Gewebe exprimiert werden. Diese fehlende Antigen-Exklusivität birgt das Risiko on-target/off-tumor-Toxizitäten und ist ein wesentlicher Grund dafür, dass bisher nur wenige CAR-T-Zelltherapien oder T-Zell-Engager für solide Tumoren zugelassen wurden.

Ein komplementärer Zugang ist die Neoantigen-basierte Vakzinierung, bei der auf Grundlage des individuellen Tumormutationsspektrums personalisierte synthetisierte Peptidvakzine verabreicht werden. Ziel ist es, tumorspezifische T-Zellen gezielt zu stimulieren und deren klonale Expansion zu fördern [18, 20]. Durch die exklusive Expression von Neoantigenen in Tumorzellen und ihre Abwesenheit im gesunden Gewebe bieten sie eine hohe Spezifität bei gleichzeitig geringem Risiko für Autoimmunität [21].

Zur weiteren Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit werden zunehmend Kombinationstherapien entwickelt, die mehrere Immunevasionsmechanismen gleichzeitig adressieren. Besonders synergistische Kombinationen aus Checkpoint-Inhibitoren, adoptiven T-Zell-Therapien und Neoantigen-Vakzinierungen zeigen in ersten Studien das Potenzial, sowohl die T-Zell-Frequenz als auch die Effektorfunktion tumorspezifischer Immunzellen nachhaltig zu steigern [18, 159].

Die gezielte Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen stellt eine der zentralen Zielsetzungen immuntherapeutischer Strategien dar. Insbesondere Neoantigene, die durch somatische Mutationen im Tumorgenom entstehen und ausschließlich in malignen Zellen exprimiert werden, bieten ein vielversprechendes therapeutisches Fenster. Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Immunogenität gelten sie als ideale Zielstrukturen für personalisierte Immuninterventionen – sei es im Rahmen von Vakzinierungsstrategien oder TCR-basierter Zelltherapien. Das folgende Kapitel widmet sich der biologischen Entstehung, der funktionellen Relevanz und den methodischen Ansätzen zur Identifikation und therapeutischen Nutzung von Neoantigenen.

1.3 Neoantigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie

Neoantigene stellen eine besonders relevante Untergruppe tumorassoziierter Antigene dar, die sich durch ihre exklusive Expression in malignen Zellen auszeichnen und im gesunden Gewebe vollständig fehlen. Sie entstehen infolge somatischer Mutationen im Tumorgenom, welche zu strukturell veränderten Proteinen führen. Diese werden intrazellulär prozessiert und in Form von Peptidfragmente über MHC-Klasse-I- oder -II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Die dadurch entstehenden neuartigen Epitope können von tumorspezifischen T-Zellen erkannt werden und stellen somit potenziell immunogene Zielstrukturen dar [160, 161]. Da Neoantigene ausschließlich in Tumorzellen vorkommen, eignen sie sich besonders für eine selektive Aktivierung des Immunsystems, ohne gleichzeitig autoreaktive Prozesse zu induzieren. Diese einzigartige Spezifität prädestiniert sie als Zielantigene für personalisierte Immuntherapien, die darauf abzielen, tumorspezifische T-Zellantworten gezielt zu aktivieren und gesunde Gewebe zu schonen.

1.3.1 Entstehung und Eigenschaften von Neoantigenen

Die Entstehung von Neoantigenen geht auf verschiedene genetische Veränderungen zurück, die im Rahmen der Tumorentwicklung erworben werden. Am häufigsten treten Punktmutationen auf, bei denen einzelne Basensubstitutionen im kodierenden Genom zu Aminosäureaustauschen führen. Diese Veränderungen können die Struktur des entsprechenden Proteins so verändern, dass bei der Prozessierung Peptidfragmente entstehen, die als neuartige Epitope im Kontext von MHC-Molekülen präsentiert und vom Immunsystem als fremd erkannt werden [161, 162].

Neben Punktmutationen spielen auch Insertionen und Deletionen (Indels), insbesondere wenn sie das Leseraster verschieben, eine bedeutende Rolle. Der dadurch induzierte Frameshift führt zur Translation aberranter Proteine mit völlig neuartigen Sequenzmotiven, die in keinem normalen Proteom vorkommen und daher besonders immunogen sein können [163].

Auch strukturelle Genomveränderungen wie chromosomale Translokationen oder Inversionen, die zur Entstehung von Genfusionen führen, können zur Bildung von Fusionsproteinen mit neuartigen Peptidsequenzen führen. Solche

Genfusionsprodukte besitzen häufig tumorexklusive Eigenschaften und können als Quelle hochimmunogener tumorspezifischer Neoantigene fungieren [164].

Darüber hinaus tragen auch posttranskriptionelle Veränderungen zur Entstehung immunogener Neoepitope bei. So kann etwa eine fehlerhafte oder alternative Spleißregulation im prä-mRNA-Prozessing zu veränderten Exon-Intron-Strukturen führen, die die Translation neuartiger Proteinprodukte ermöglichen. Diese abweichenden Transkripte können in Peptidsequenzen resultieren, die in gesunden Zellen nicht vorkommen und somit potenziell immunogen sind. Neben den Veränderungen im kodierenden Bereich des Genoms können auch Mutationen in nicht-kodierenden regulatorischen Sequenzen die Neoantigenlandschaft beeinflussen. Veränderungen in Promotor- oder Enhancerregionen, aber auch epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histonveränderungen, können zur aberranten oder verstärkten Expression bestimmter Gene führen, deren Produkte im gesunden Gewebe nicht oder nur in sehr geringer Menge exprimiert werden [165]. Auch diese überexprimierten Proteine können über das MHC-System prozessiert und präsentiert werden und so zum individuellen Neoantigenprofil des Tumors beitragen.

Gemeinsam ist all diesen Mechanismen, dass sie zur Entstehung tumorspezifischer Peptidsequenzen führen, die über die endogene oder exogene Antigenverarbeitung im MHC-Kontext präsentiert und von T-Zellen erkannt werden können. Die vollständige Abwesenheit dieser Antigene im gesunden Gewebe verleiht ihnen eine hohe therapeutische Selektivität und minimiert das Risiko autoimmuner Nebenwirkungen. Aufgrund dieser Eigenschaften nehmen Neoantigene eine Schlüsselrolle in der Entwicklung personalisierter Immuntherapien ein – sowohl im Rahmen peptidbasierter Vakzinierungen als auch TCR-vermittelter Zelltherapien

1.3.2 Identifikation von Neoantigenen

Die Identifikation tumorspezifischer Neoantigene basiert auf einem mehrstufigen analytischen Prozess, der molekulargenetische Hochdurchsatzmethoden mit bioinformatischen Vorhersagealgorithmen kombiniert. Zunächst werden mittels Exom- und Transkriptomsequenzierung sowohl das Tumorgewebe als auch ein entsprechendes Referenzgewebe – in der Regel peripheres Blut oder gesundes Nachbargewebe – analysiert, um somatische Mutationen zu identifizieren, die zur Bildung potenziell immunogener Proteinvarianten führen können [161, 166]. Hierbei werden sowohl Punktmutationen als auch Insertionen, Deletionen und Genfusionen

berücksichtigt, da all diese Veränderungen potenziell zur Entstehung tumorspezifischer Peptide führen, die nach proteasomaler Prozessierung über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Im Anschluss an die Mutationserkennung erfolgt eine *in silico*-Bewertung der entstehenden Peptide hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an MHC-Klasse-I- oder -II-Moleküle. Zur Vorhersage der MHC-Bindungsaffinität werden etablierte Algorithmen wie NetMHC, NetMHCpan oder SYFPEITHI verwendet, die auf bekannten Peptid-MHC-Bindungsmotiven basieren [3, 167, 168].

Die Vorhersage für MHC-Klasse-I-Moleküle ist vergleichsweise zuverlässig, da deren Bindungsdomäne eine definierte Peptidlänge von in der Regel 8 bis 11 Aminosäuren aufweist. Deutlich schwieriger gestaltet sich die Vorhersage für MHC-Klasse-II-Moleküle, deren offene Bindungsfurche eine größere Peptidflexibilität erlaubt. Die exakte Positionierung der mutierten Aminosäure im Peptid wird dadurch erschwert, was die Aussagekraft der algorithmischen Bewertung limitiert [169].

Um sicherzustellen, dass die Mutation tatsächlich innerhalb der vorhergesagten Epitope liegt, wurde die mutierte Aminosäure standardisiert in die zentrale Position eines 15-mer-Peptids eingebettet. In Fällen, in denen ein kurzes, hochaffines Peptid bereits vollständig in einem längeren Peptid enthalten war, wurde das 15-mer bevorzugt, um die Chancen für die Präsentation über MHC-Klasse-II zu erhöhen. Lag kein entsprechender Überlapp vor, wurde das kurze Peptid als eigenständiger Neoantigenkandidat weitergeführt. Die Auswahlkriterien richteten sich jedoch nicht allein nach der vorhergesagten MHC-Bindung, sondern bezogen zusätzlich die Transkriptexpression des mutierten Gens und die mutierte Allelfrequenz mit ein, um die immunologisch und biologisch relevantesten Kandidaten zu priorisieren [170].

Neben immunologischen Gesichtspunkten flossen auch produktionstechnische Kriterien in die endgültige Auswahl ein. So wurden Peptide, die aufgrund instabiler C-Termini oder des Vorhandenseins von Cystein potenziell problematische Eigenschaften in der synthetischen Herstellung oder Lagerung aufwiesen, ausgeschlossen, um eine GMP-konforme Produktion zu gewährleisten.

Ein direkter experimenteller Nachweis der tatsächlich präsentierten Peptide wäre theoretisch durch massenspektrometrische Analyse des Peptidrepertoires möglich. Diese Methode erlaubt die direkte Identifikation von auf MHC-Molekülen gebundenen Peptiden aus Tumorzellen und würde eine unabhängige Validierung der *in silico* vorhergesagten Kandidaten ermöglichen. In den hier betrachteten Studien – IVAC-ALL-1, IVAC-RCC sowie in den individuellen Heilversuchen – stand

diese Methode jedoch nicht zur Verfügung. Dennoch könnte sie perspektivisch eine zentrale Rolle in der systematischen Validierung von Neoantigenen einnehmen und zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit und klinischen Relevanz beitragen.

1.3.3 Neoantigen-basierte Immuntherapien

Die tumorspezifische Expression von Neoantigenen macht sie zu einer hochattraktiven Zielstruktur für eine Reihe innovativer immuntherapeutischer Strategien. Im Fokus stehen dabei insbesondere T-Zell-basierte Ansätze, die entweder auf einer direkten Erkennung über den TCR oder auf gentechnischer Modifikation zur gezielten Antigenerkennung beruhen. Durch die Kombination molekularer Diagnostik, funktioneller T-Zell-Analyse und zellbasierter Therapieplattformen lassen sich tumorspezifische T-Zell-Antworten patientenindividuelle gezielt induzieren oder reaktivieren

1.3.3.1 Neoantigen-spezifische T-Zell-Therapien

Bei der TCR-basierten T-Zell-Therapie werden autologe oder allogene T-Zellen mit einem tumorspezifischen T-Zell-Rezeptor ausgestattet, der ein definiertes Neoantigen im Kontext eines passenden HLA-Moleküls erkennt. Die genetisch modifizierten T-Zellen werden *ex vivo* expandiert und anschließend der Patientin beziehungsweise dem Patienten reinfundiert. Dieser Ansatz erlaubt die gezielte Elimination von Tumorzellen, die intrazelluläre Neoantigene exprimieren, und stellt damit eine wesentliche Erweiterung im Spektrum adoptiver Zelltherapien dar, das bisher weitgehend auf Oberflächenantigene beschränkt war. Erste klinische Studien zeigen, dass TCR-T-Zellen in der Lage sind, gegen mutierte Tumorantigene wie KRAS^{G12D} (*KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) oder das kanonische Cancer-Testis-Antigen NY-ESO-1 eine funktionelle Immunantwort zu vermitteln [171, 172]. Ein zentraler Vorteil dieser Strategie besteht in der hohen Spezifität für intrazelluläre Zielantigenen, deren Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt. Gleichzeitig stellt die MHC-Restriktion jedoch eine therapeutische Limitation dar, da der TCR nur dann funktional ist, wenn das Zielantigen im Kontext eines passenden HLA-Allels präsentiert wird. Diese Einschränkung erfordert eine präzise HLA-Typisierung und schränkt die Anwendbarkeit auf bestimmte Patientensubgruppen ein.

Ein konzeptionell neuer, derzeit noch experimenteller Ansatz besteht in der Kombination von TCR- und CAR-Technologien. Dabei werden sogenannte TCR-CAR-T-Zellen entwickelt, die prinzipiell in der Lage sind, intrazelluläre

Neoantigene im MHC-Kontext zu erkennen, gleichzeitig jedoch zusätzliche Signalkomponenten aus der CAR-Domäne integrieren, um die Aktivierungsstärke und Funktionalität zu verbessern [173]. Diese Technologie befindet sich noch im präklinischen Entwicklungsstadium, bietet aber das Potenzial, die Spezifität klassischer CAR-T-Zellen um die Fähigkeit zur intrazellulären Antigenerkennung zu erweitern und gleichzeitig Limitierungen der TCR-Plattform – insbesondere hinsichtlich HLA-Bindung und Signalweiterleitung – zu überwinden. Bisherige Daten belegen die Machbarkeit des Konzepts *in vitro* und in Tiermodellen, klinische Anwendungen stehen jedoch noch aus. Zudem ist die Entwicklung auf ein einzelnes Zielpeptid beschränkt, was das Risiko für Tumorescape erhöht. Auch die technische Komplexität und die damit verbundenen Kosten stellen bislang eine erhebliche Hürde für die klinische Translation dar.

1.3.3.2 Neoantigen-basierte Peptidvakzinierung

Die therapeutische Vakzinierung mit patientenspezifisch ausgewählten Neoantigen-Peptiden stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, gezielt tumorspezifische T-Zellen zu aktivieren und eine funktionelle Immunantwort gegen maligne Zellen zu induzieren. Im Zentrum dieses Konzepts steht die Identifikation mutierter, ausschließlich in Tumorzellen exprimierter Peptide, die anschließend in Form synthetischer Impfstoffe verabreicht werden. Ziel ist es, sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen zu stimulieren, deren klonale Expansion zu fördern und damit eine immunologische Kontrolle des Tumors zu ermöglichen. Klinische Studien konnten zeigen, dass Neoantigen-basierte Peptidvakzine robuste tumorspezifische T-Zell-Antworten auszulösen können [18, 20, 21]. Im Rahmen der IVAC-Studien („Individuelle Vakzinierung gegen Krebs“) wurde das Tumorgenom aller Patientinnen und Patienten zunächst sequenziert und bioinformatisch ausgewertet, um eine priorisierte Liste potenzieller Neoantigen-Kandidaten zu erstellen.

Um die meist schwach immunogenen Peptide in ihrer Wirkung zu verstärken, werden sie in der Regel mit Adjuvantien kombiniert, die über die Aktivierung der angeborenen Immunität die Reifung antigenpräsentierender Zellen fördern. Dies ermöglicht eine effektive Antigenpräsentation und kostimulatorische Signalgebung zur optimalen T-Zell-Aktivierung. Die zugrunde liegende immunologische Wirkweise peptidbasierter Vakzine beruht auf der Präsentation synthetischer Peptide durch APCs. Nach subkutaner oder intradermaler Injektion werden die freien Peptide lokal von dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen an deren Oberfläche präsentiert. Kurze Peptide können zudem direkt in die Peptidbindungsfurche präformierter MHC-Moleküle geladen

werden, wo sie endogene Liganden verdrängen. Durch Kreuzpräsentation gelangen bestimmte exogene Peptide auch in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg, was die Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen ermöglicht. Parallel dazu fördern geeignete Adjuvanzien über Mustererkennungsrezeptoren wie TLR1/2 oder TLR3 die Reifung der dendritischen Zellen. Dies führt zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und schafft so die Voraussetzung für eine effektive T-Zellaktivierung. Erst das koordinierte Zusammenspiel aus spezifischer Antigenpräsentation und adjuvanzvermittelter Aktivierung von APCs ermöglicht eine robuste, tumorspezifische T-Zell-Antwort. Die synthetisch hergestellten Peptide werden in personalisierter Form verabreicht, häufig in Kombination mit immunmodulatorischen Adjuvanzien wie Poly-ICLC, einer stabilisierten Form von doppelsträngiger RNA (Polyinosin:Polycytidylsäure), die durch Komplexbildung mit Poly-L-Lysin und Carboxymethylcellulose biologisch stabilisiert wird, oder GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), einem Zytokin, das die Migration und Reifung dendritischer Zellen fördert und so die Antigenpräsentation unterstützt.

Die induzierten Immunantworten umfassten sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-Effektorzellen und konnten in Einzelfällen zu einer klinischen Kontrolle des Tumors führen. Neben den initialen klinischen Studien aus Boston und Mainz, in denen die Machbarkeit, Immunogenität und therapeutische Relevanz personalisierter Neoantigen-Vakzinen in unterschiedlichen Tumorentitäten – darunter Melanom und Glioblastom – demonstriert wurde [18, 20, 21], konnte das Konzept auch in Tübingen erfolgreich weiterentwickelt und klinisch implementiert werden. Erste Ergebnisse aus prospektiven Studien bei Patientinnen und Patienten mit akuten Leukämien, Gliomen und lymphatischen Neoplasien belegen, dass personalisierte Multi-Peptid-Vakzinen – teils in Kombination mit innovativen Adjuvanzien wie XS15 – sicher applizierbar sind, eine messbare Immunantwort induzieren und auch in kurativen Therapiekontexten Anwendung finden könnten. XS15 ist ein synthetisches Lipopeptid und TLR1/2-Agonist, der zur Verstärkung zellulärer Immunantworten entwickelt wurde [22, 174].

1.3.3.3 Kombinationstherapien mit Checkpoint-Inhibitoren

Die therapeutische Wirksamkeit Neoantigen-basierter Immunstrategien kann durch Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren weiter verstärkt werden. Zahlreiche Tumoren nutzen inhibitorische Immun-Checkpoints wie PD-1/PD-L1 oder CTLA-4 gezielt, um tumorspezifische T-Zellen funktionell zu hemmen und so der Immunüberwachung zu entgehen. Die Blockade dieser Signalachsen erlaubt eine Reaktivierung funktionell erschöpfter T-Zellen und kann insbesondere in

Kombination mit vakzinevermittelter T-Zell-Stimulation eine synergistische Verstärkung der Immunantwort erzielen [13, 154]. Von besonderer Relevanz ist hierbei die PD-1/PD-L1-Achse, deren Interaktion maßgeblich zur Inhibierung tumorspezifischer T-Zellen beiträgt und durch therapeutische Antikörper gezielt aufgehoben werden kann [15, 16].

Neben der Kombination mit Checkpoint-Inhibition besteht ein weiteres vielversprechendes Konzept in der Verbindung von Neoantigen-Vakzinierung mit adoptiver T-Zell-Therapie. Während die Vakzine eine initiale Aktivierung und Expansion tumorspezifischer T-Zellen in der Patientin beziehungsweise im Patienten induziert, kann die zusätzliche Infusion gentechnisch modifizierter und *ex vivo* expandierter T-Zellen die Frequenz und Funktionalität tumorspezifischer Klone weiter erhöhen. Präklinische Modelle und erste klinische Ansätze deuten darauf hin, dass durch solche Kombinationsstrategien sowohl die Breite als auch die Tiefe der Immunantwort gesteigert werden können. Perspektivisch könnten diese Ansätze dazu beitragen, immunologische Tumorkontrolle bei Patientinnen und Patienten zu etablieren, bei denen monotherapeutische Strategien bislang nicht ausreichend wirksam sind.

1.3.4 Limitationen und Perspektiven Neoantigen-basierter Therapien

Trotz des vielversprechenden Potenzials von Neoantigenen als hochspezifische Zielstrukturen für T-Zell-vermittelte Immuntherapien bestehen derzeit noch mehrere relevante Herausforderungen, die ihre klinische Wirksamkeit einschränken können. Eine der zentralen Schwierigkeiten liegt in der inter- und intratumoralen Heterogenität, also in der genetischen Diversität zwischen verschiedenen Tumorzellen einer Patientin beziehungsweise eines Patienten sowie innerhalb desselben Tumors [175].

Da Neoantigene auf somatischen Mutationen beruhen, variieren sie stark zwischen unterschiedlichen klonalen Subpopulationen, was zur Folge haben kann, dass eine auf ein bestimmtes Neoantigen ausgerichtete Immuntherapie nur einen Teil der Tumorzellen erfasst, während andere immunologisch nicht adressiert werden und unbehelligt weiter proliferieren [176].

Hinzu kommt die HLA-Restriktion, die eine wesentliche Determinante für die Präsentation von Neoantigenen darstellt. Da die Bindung eines Peptids an MHC-Moleküle durch das individuelle HLA-Genotypprofil bestimmt wird, kann ein

und dasselbe Neoantigen nur dann wirksam präsentiert werden, wenn es mit einem vorhandenen HLA-Allel kompatibel ist. Diese Einschränkung führt dazu, dass bestimmte Neoantigene nur für ausgewählte Patientengruppen therapeutisch relevant sind, und stellt damit eine Hürde für die translationale Skalierbarkeit individueller Therapiekonzepte dar [177, 178]. Eine präzise HLA-Typisierung ist daher eine zwingende Voraussetzung, um geeignete Zielstrukturen zu identifizieren und potenzielle Therapieansätze individuell zu planen.

Neben der antigenbezogenen Selektivität stellt auch das immunsuppressive Tumormikromilieu eine erhebliche Barriere für die Effektivität von Neoantigen-basierten Strategien dar. Immunregulatorische Zelltypen wie Tregs und MDSCs sowie die Expression inhibitorischer Liganden wie PD-L1 können die Aktivierung und Funktion tumorspezifischer T-Zellen stark beeinträchtigen und dadurch die therapeutische Wirksamkeit deutlich reduzieren [179]. Diese immunologischen Gegenkräfte müssen im Rahmen kombinatorischer Ansätze gezielt adressiert werden.

Auch auf methodischer Ebene besteht noch Optimierungspotenzial, insbesondere im Bereich der prädiktiven Modellierung immunogener Epitope. Während die Algorithmen zur Identifikation MHC-Klasse-I-gebundener Peptide mittlerweile relativ verlässlich arbeiten, bleibt die Vorhersage MHC-Klasse-II-gebundener Neoantigene weiterhin eine Herausforderung. Die größere Flexibilität der offenen Peptidbindungstasche von MHC-II-Molekülen hinsichtlich Peptidlänge und Bindungsposition erschwert die präzise Erkennung relevanter Bindungsmotive und begrenzt somit die Aussagekraft bioinformatischer Modelle.

Vor dem Hintergrund dieser biologischen und technischen Herausforderungen gewinnen kombinatorische Therapieansätze zunehmend an Bedeutung. Die gezielte Verknüpfung von Neoantigen-Vakzinierung mit Checkpoint-Inhibition, adoptiver T-Zell-Therapie oder immunmodulatorischen Substanzen bietet die Möglichkeit, immunologische Schwachstellen gezielt zu kompensieren und die therapeutische Effizienz zu steigern. Ziel ist es, durch diese synergetischen Strategien eine robuste, breit angelegte und zugleich selektive antitumorale Immunantwort zu etablieren – als Fundament für eine effektive, langfristige Tumorkontrolle im Sinne einer personalisierten Krebsimmuntherapie.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Neoantigene eine zentrale Rolle in der Entwicklung personalisierter Immuntherapien spielen können – insbesondere dann, wenn sie funktionell relevante T-Zell-Antworten auslösen und zugleich tumorexklusiv sind. Die Identifikation solcher Zielstrukturen sowie deren immunologische Validierung sind daher von entscheidender Bedeutung für die

Weiterentwicklung präziser T-Zell-basierter Therapien. Vor diesem Hintergrund analysiert die vorliegende Arbeit klonal und funktionell tumorspezifische T-Zell-Rezeptoren nach Peptidvakzinierung und untersucht ihr Potenzial zur gezielten Erkennung und Eliminierung tumorassoziierter Zielzellen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Klinische Studien zeigen, dass Peptidvakzinierungen tumorspezifische T-Zell-Antworten induzieren können. Unklar ist jedoch, wie sich diese Antworten auf klonaler Ebene manifestieren und welche funktionellen Eigenschaften die resultierenden TCRs besitzen. Ein vertieftes Verständnis der durch Vakzinierung aktivierten T-Zell-Repertoires sowie der Antigenpezifität einzelner TCRs ist jedoch essenziell, um personalisierte, TCR-basierte Immuntherapien gezielt weiterzuentwickeln. Hierdurch lassen sich neue Kriterien zur Identifikation vielversprechender TCR-Kandidaten ableiten, etwa anhand funktioneller Merkmale oder Bindungsspezifität. Die Klonalität der Antwort – insbesondere eine oligoklonale Expansion – kann darüber hinaus Hinweise auf die Immunselektivität, potenzielle *Escape*-Mechanismen und die therapeutische Robustheit einzelner T-Zell-Klone liefern.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die durch eine individuelle Peptidvakzinierung induzierte T-Zell-Antwort sowohl auf klonaler als auch auf funktioneller Ebene umfassend zu charakterisieren. Im Zentrum steht die Analyse tumorspezifischer TCRs, die aus aktivierten CD154⁺- oder IFN γ ⁺-T-Zellen isoliert, sequenziert und anschließend funktionell überprüft werden. Mithilfe von Einzelzellsequenzierung soll zunächst die klonale Zusammensetzung dieser Zellen aufgeklärt und untersucht werden, ob die Antwort oligoklonal geprägt ist oder ein breites Repertoire tumorspezifischer TCRs umfasst.

In einem zweiten Schritt erfolgt die funktionelle Charakterisierung ausgewählter TCRs. Diese werden mittels OTR in ein standardisiertes reporterbasiertes Testsystem (J-TPR) überführt, um ihre Antigenpezifität, Signalweiterleitung und Aktivierungspotenz im Kontext autologer HLA-Moleküle zu analysieren. Ergänzend werden sogenannte *Blasten-Challenge*-Experimente durchgeführt, bei denen expandierte T-Zellen mit antigenbeladenen autologen B-Zell-Blasten kokultiviert werden, um deren Funktionalität unter physiologisch relevanten Bedingungen zu evaluieren.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit widmet sich der Untersuchung der HLA-Expression auf B-Zell-Blasten, die als antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der T-Zell-Aktivierung einnehmen. Durch quantitative FACS-Analysen (QIFIKIT) soll ermittelt werden, inwieweit Unterschiede in der HLA-Dichte die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen beeinflussen und welche Konsequenzen sich daraus für die Antigenpräsentation ergeben. Da die effektive Präsentation von Impfpeptiden das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl passender HLA-Moleküle voraussetzt, kann die HLA-Dichte zudem als funktioneller Hinweis auf die Präsentationsfähigkeit der Blasten dienen. Perspektivisch könnten solche Parameter genutzt werden, um Patientengruppen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für ein funktionelles Ansprechen zu identifizieren.

Um darüber hinaus die funktionelle Charakterisierung tumorspezifischer TCRs unabhängig von limitiertem Patientenmaterial zu ermöglichen, wurde die Methode des OTR mittels CRISPR-Cas9 etabliert und optimiert. Durch die Implementierung dieser Technik können potenziell antigenspezifische T-Zellen für experimentelle Analysen generiert werden, was insbesondere für weiterführende funktionelle Untersuchungen von Vorteil ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Selektion und funktionelle Validierung tumorspezifischer TCRs gezielter zu gestalten. Langfristig könnten die hier erarbeiteten Kriterien zur Identifikation hochaffiner, tumorspezifischer TCRs einen Beitrag zur Weiterentwicklung individualisierter, TCR-basierter Immuntherapien leisten. Konkret werden das impfstoffinduzierte TCR-Repertoire aus klinischen Studien analysiert, ausgewählte TCRs funktionell validiert und eine orthotope TCR-Integration mittels CRISPR-Cas9 in T-Zellen etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Geräte

CO ₂ -Begasungsbrutschrank Heraeus Hera Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CO ₂ -Begasungsbrutschrank Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dispenser Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer FACSCanto™ II	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer LSRFortessa™	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Aria™ III Cell Sorter	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Elektrophoresekammern B1A und B2	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese Netzteil EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophorese Netzteil PowerPac	BioRad, München
Fein- und Tischwaagen	Sartorius, Göttingen
GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Tyto®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette Discovery 20 – 200 µl	Abimed, Langenfeld
NanoDrop 2000	Peqlab, Erlangen
Odyssey XF Imager,	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, Schweiz

Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Sterilbank Biowizard	Kojair, Mänttä-Vilppula, Finnland
UV-Lichtquelle UVL-18 EL Series, 8 Watt, 365 nm/White	Analytik Jena US, Upland, USA
Vortex Reagenzglasnischer	neoLab, Heidelberg
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien sowie Glas- und Kunststoffwaren

Bechergläser, Glas	Schott, Mainz
Bechergläser, Plastik	Vitalab, Großostheim
Combitips advanced	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser, 24 x 50 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Einfrierbehältnis Mr. Frosty	Nalgene, Hereford, UK
Einmalpipetten Plastik 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	B. Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Schott, Mainz
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MACSQuant® Tyto® Cartridge HS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Messzylinder Plastik 250 ml, 500 ml, 1 l	Vitalab, Großostheim
Mikrotiterplatte Costar 96 Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Rundboden	
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Weinheim
Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten, Long size	WU, Mainz
PCR-Platte Vollrand, 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 35 mm, 94 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen mit Belüftungsnocken 90 x 16 mm	Carl Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen MBP 10 µl	Sigma, Steinheim
Pipettenspitzen, gestopft 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Oldendorf
Plattenversiegelungsfolien (Plate Sealer)	BioLegend, San Diego, USA
Polypropylen-Röhrchen 50 ml („Falcon“)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrol-Röhrchen 15 ml („Falcon“)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Professional, RosWell, USA
Pre-Separation Filters (20 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Reagenzreservoir 25 ml, 100 ml	VWR, Radnor, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Rundboden-Röhrchen Falcon 15 ml	BD, Heidelberg
Siegelfolie PCR-AS-600	Axygen Scientific, Union City, USA
Safety-Multifly-Kanülen, Butterfly, Nr.2 grün	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Braun, Tuttlingen
S-Monovetten Serum, EDTA K2-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flach-/Rundboden 96-Kavitäten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flachboden 6-Kavitäten	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten Flachboden 12-Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturplatten Flachboden 24- und 48-Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Zählkammer C-Chip Neubauer improved	Roth, Karlsruhe
Zellsieb Nylon 40 µm, 70 µm, 100 µm	BD, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agar-Agar, plant	Carl Roth, Karlsruhe
------------------	----------------------

Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, USA
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol 50 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biocoll Separationslösung	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA) A-3059, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Destilliertes Wasser, DNase / Rnase frei	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Biotin 50 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol, vergällt (96%)	SAV-Liquid Production, Flintsbach
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA-Lösung pH 8.0 0,5 M	PanReac AppliChem, Gatersleben
FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow	BD, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung 37 %	PanReac AppliChem, Gatersleben
Heparin-Natrium 25.000 U/ml	ratiopharm, Ulm
Incidin Plus	ECOLAB Healthcare, Monheim a.R.
Isopropanol	Merck, Darmstadt
IVIg-Präparat Privigen (humane Immunglobuline)	CSL Behring, King of Prussia, USA
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe
Lysing-Buffer	Uniapotheke, Tübingen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Peptide Flex-T™ Monomer UVX,	BioLegend, San Diego, USA
Saponin S-7900, Sapogenin ≥ 10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptavidin-APC (fluorophor-konjugiert)	BioLegend, San Diego, USA
Streptavidin-BV421 (fluorophor-konjugiert)	BioLegend, San Diego, USA
TBE-Puffer (10x)	Uniapotheke, Tübingen
TexMACS-Medium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween-20	PanReac AppliChem, Gatersleben

2.1.3.1 Zellkulturreagenzien und –additive

AB Humanserum, hitzeinaktiviert	Life Technologies, Carlsbad, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I (aus Rinderpankreas, 100 mg)	Roche, Mannheim
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gentamicin (50 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GolgiStop (Monensin)	BD, Heidelberg
Hepes	Roth, Karlsruhe
IMDM mit Hepes und L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin [200 mM]	Biochrom AG, Berlin
MACS Freezing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Poly-L-Glutaminsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proleukin S IL-2	Novartis, Basel, Schweiz
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3.2 Stocklösungen für die Zellkultur

β -Mercaptoethanol-Stocklösung [100 mM]	in DPBS
Brefeldin A-Stocklösung [5 mg/ml]	in DMSO
DNase I-Stocklösung [10 mg/ml]	in ddH ₂ O
Ionomycin-Stocklösung [1 mM]	in Ethanol
PMA-Stocklösung [100 μ g/ml]	in DMSO
Proleukin S IL-2 [20.000 IU/ml], [1x10 ⁶ IU/ml]	in ddH ₂ O

2.1.3.3 Zellkulturmedien

T-Zell-Medium	10 % AB Humanserum 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamint 1 % Hepes Puffer (1M) 50 μ M β -Mercaptoethanol in 500 ml IMDM
Auftaumedium	3 μ g/ml DNase I in Vollmedium
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
RPMI 1640-10 %-Medium	10 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin in RPMI 1640

2.1.3.4 Molekularbiologische Puffer und Medien

Ampicillin-Stocklösung [100 mg/ml]	Ampicillin in ddH ₂ O
dNTP Mix (10 mM each)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TriTrack DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O, pH 7
LB-Amp-Platten	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar 5 g NaCl 1 ml Ampicillin-Stocklösung ad 1 l ddH ₂ O, pH 7
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in ddH ₂ O, pH 8.5
Peqlab peqGREEN, DNA/RNA Farbstoff	VWR, Radnor, USA
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3.5 Verwendete Enzyme

Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, USA
Herculase II Fusion DNA Polymer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.1.3.6 Durchflusszytometrische Puffer und Reagenzien

AB Humanserum	Lonza, Basel, Schweiz
Cytofix/Cytoperm Fixierungs- und Permeabilisierungslösung	BD, Heidelberg
FACS-Fix	1% Formaldehyd-Lösung 37 % In FACS-Puffer
PBSE-Puffer	2 mM EDTA in 1x DPBS
FACS-Puffer	2 mM EDTA 2 % fötales Kälberserum (FCS) 0,01 % Natriumazid in 1x DPBS
FACS-Fleboy-Puffer	2 mM EDTA 1 % fötales Kälberserum (FCS) 0,01 % Natriumazid 50 µg/ml IVIg-Präparat in 1x DPBS
MACS-Puffer	2mM EDTA 0,5 % BSA
MACSQuant Tyto Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PermWash-Puffer	0,1 % Saponin S-7900 0,5 % BSA 0,02 % Natriumazid in 1x DPBS
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	QIAGEN, Hilden

2.1.3.7 Kommerziell erhältliche gebrauchsfertige Kits

AbC Anti-Mouse Bead Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
-------------------------	----------------------------------

ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
QIFIKIT	Dako, Hamburg
peqGOLD Plasmid MiniPrep Kit I	VWR, Radnor, USA
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren

2.1.4 Biologisches Zellmaterial und klinisches Probenmaterial von Patientinnen und Patienten

Für die Experimente dieser Arbeit wurden sowohl Zellmaterial von Patientinnen und Patienten als auch Proben gesunder Spenderinnen und Spender verwendet. Die Proben stammten aus unterschiedlichen Studienkontexten und klinischen Zusammenhängen, die nachfolgend näher erläutert werden.

2.1.4.1 Klinisches Probenmaterial von Patientinnen und Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff „Blasten“ für zwei unterschiedliche Zelltypen verwendet. Einerseits bezeichnet er leukämische Blasten, die aus Blut- oder Knochenmarkproben von Patientinnen und Patienten mit hämatologischen Neoplasien isoliert wurden. Andererseits wird der Begriff „B-Zell-Blasten“ für durch CD40L- und IL-4-Stimulation aktivierte B-Zellen verwendet, die aus PBMCs gesunder Spenderinnen und Spender generiert und als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt wurden. Beide Zelltypen kamen in unterschiedlichen experimentellen Kontexten zum Einsatz.

Periphere mononukleäre Blutzellen wurden aus Proben der IVAC-ALL-1-Studie, den begleitenden *Follow-up*-Untersuchungen (IVAC-AN), der IVAC-RCC-001-Studie sowie aus Einzelheilversuchen gewonnen. Hierbei kamen sowohl kryokonservierte als auch frisch isolierte PBMCs von Patientinnen und Patienten zum Einsatz, die eine individualisierte Peptidvakzinierung erhalten hatten.

Darüber hinaus wurden leukämische Blasten aus peripherem Blut sowie aus Knochenmarkproben von Patientinnen und Patienten mit hämatologischen Neoplasien isoliert. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist eine maligne Erkrankung lymphatischer Vorläuferzellen, die durch eine Akkumulation unreifer Blasten im Knochenmark und peripheren Blut gekennzeichnet ist. In dieser Arbeit wurden ALL-Blasten als Modellsystem zur Analyse tumorspezifischer T-Zell-Antworten verwendet. Diese Zellen kamen in sogenannten

Blasten-Challenge-Experimenten als APCs zum Einsatz, um die T-Zellantwort auf tumoreigene Antigene funktionell zu überprüfen.

Zur quantitativen Bestimmung der Oberflächendichte von HLA-Klasse-I- und -II-Molekülen auf ALL-Blasten wurde eine indirekte Durchflusszytometrie unter Verwendung des QIFIKIT™ (Dako) durchgeführt. Die Quantifizierung basierte auf der Detektion muriner monoklonaler Antikörper, deren Signal mit kalibrierten Referenzpartikeln korreliert wurde. Für diese Analysen wurden kryokonservierte PBMCs von Patientinnen und Patienten mit diagnostizierter akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) verwendet.

2.1.4.2 Gesunde Spenderinnen und Spender

Als Kontrollgruppe wurden Proben gesunder Spenderinnen und Spender herangezogen. Es wurden PBMCs verwendet, die nach dem gleichen Verfahren wie jene der Patientinnen und Patienten isoliert und prozessiert wurden. Die Proben stammten aus der klinischen Transfusionsmedizin Tübingen.

2.1.4.3 Kryokonservierung und standardisierte Handhabung biologischer Probenmaterialien

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme kryokonserviert, um Zellviabilität und funktionelle Eigenschaften bestmöglich zu erhalten. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff unter Verwendung eines Mediums aus 90 % fetalem Kälberserum (FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) oder eines kommerziell erhältlichen Einfriereserums.

Vor der experimentellen Verwendung wurden die Proben unter standardisierten Bedingungen aufgetaut und weiterverarbeitet.

2.1.4.4 Ethische Genehmigungen

Die Entnahme und Verwendung der Proben erfolgten im Einklang mit den geltenden ethischen Richtlinien und nach Zustimmung durch die jeweils zuständigen Ethikkommissionen. Vor der Probenentnahme erteilten sowohl Patientinnen und Patienten als auch gesunde Spenderinnen und Spender eine schriftliche informierte Einwilligung.

2.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, USA) synthetisiert und bezogen.

2.1.5.1 Primer zur Amplifizierung von hTRAC HDR

Zur Amplifizierung der hTRAC-HDR-Sequenzen wurden folgende Primer eingesetzt:

- *hTRAC HDR forward*: 5'-CTG CCT TTA CTC TGC CAG AG-3'
- *hTRAC HDR reverse*: 5'-CAT CAT TGA CCA GAG CTC TG-3'

2.1.5.2 RNA-Oligonukleotide für CRISPR-Cas9

Für das CRISPR-Cas9-System wurden folgende RNA-Komponenten verwendet:

Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA

Integrated DNA Technologies
(IDT), Coralville, USA

2.1.6 Verwendeter Transformationsvektor

Die in dieser Arbeit verwendeten TCR-Konstrukte wurden von Twist Bioscience (San Francisco, USA) synthetisiert und in den Vektor *pTwist AMP* kloniert, der anschließend als Transformationsvektor diente.

2.1.7 Transformationsstamm *E. coli DH5α*

Für die Transformationen wurde der *E. coli*-Stamm *DH5α* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Der Genotyp lautet:

F– ϕ 80lacZΔ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK– mK+) *phoA supE44 λ- thi–1 gyrA96 relA1*.

2.1.8 Patientinnen und Patienten sowie zugehörige Studienkontexte

Für die vorliegende Arbeit wurden Proben von Patientinnen und Patienten analysiert, die im Rahmen der prospektiven Phase-I/II-Studie IVAC-ALL-1 (EudraCT-Nummer: 2015-005281-29, ClinicalTrials.gov: NCT03559413) behandelt worden waren. Die Studie wurde auf Grundlage eines positiven Ethikvotums durchgeführt; alle Teilnehmenden wurden umfassend aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche informierte Einwilligung.

Die PBMC-Proben wurden zu vordefinierten Visiten (V1–Vn) im Rahmen des klinischen Studienprotokolls entnommen und unter standardisierten Bedingungen kryokonserviert. Darüber hinaus kamen Proben aus der IVAC-ALL-1-ANALYSIS-Studie (IVAC-AN) zum Einsatz, einer nachgelagerten Auswertung der ursprünglichen IVAC-ALL-1-Studie. Hierbei wurden insbesondere *Follow-up*-Proben untersucht. Auch in diesem Fall erfolgten die Probenverwendung und Datenerhebung unter Einhaltung der geltenden ethischen Vorgaben sowie nach erneuter schriftlicher Einwilligung der Patientinnen und Patienten beziehungsweise ihrer gesetzlichen Vertreterinnen und Vertreter.

Zudem wurden Proben aus der monozentrischen, prospektiven Phase-Ib-Studie IVAC-RCC-001 (EudraCT-Nummer: 2021-003516-79; ClinicalTrials.gov: NCT05641545) sowie im Rahmen zweier individueller Heilversuche (Einzelheilversuche) erhoben und in die Analysen einbezogen.

Alle genannten Vorhaben wurden durch die jeweils zuständigen Ethikkommissionen der beteiligten Einrichtungen genehmigt.

2.1.9 Primärzellmaterial

2.1.9.1 Blutproben gesunder Spenderinnen und Spender

Blutproben gesunder Spenderinnen und Spender wurden nach umfassender Aufklärung und schriftlicher informierter Einwilligung entnommen. Die Probengewinnung und -verwendung erfolgten im Einklang mit den geltenden ethischen Richtlinien und wurden durch ein entsprechendes Ethikvotum genehmigt.

2.1.9.2 Pädiatrische Blut- und Knochenmarksproben

Blut- und Knochenmarksproben zur Gewinnung von PBMCs, mononukleären Knochenmarkszellen (KM-MNCs) sowie leukämischen Blasten wurden von

Patientinnen und Patienten mit ALL nach umfassender Aufklärung und schriftlicher informierter Einwilligung der jeweiligen gesetzlichen Vertreterinnen beziehungsweise Vertreter entnommen.

Die Proben stammten aus Routineblutentnahmen aus peripherem Blut beziehungsweise aus Restmaterial diagnostischer Knochenmarkspunktionen. Die Isolierung und Kryokonservierung erfolgten durch das KMT-Labor der Kinderklinik Tübingen.

Sowohl die Proben als auch die zugehörigen klinischen Daten wurden bei Aufnahme in die Gewebe-, Blut- oder Datenbank pseudonymisiert. Die Verwendung von Proben und Daten wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen unter den Projektnummern 720/2015AMG1 (01. März 2016) und 285/2022BO (09. November 2022) genehmigt.

2.1.10 Verwendete Zelllinien

J-TPR (CD8⁺)

Diese humane T-Zell-Linie basiert auf der Jurkat *triple parameter reporter* (J-TPR) Zelllinie und wurde von unserem Kooperationspartner am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München bereitgestellt. Die Zellen enthalten ein fluoreszenzbasiertes Reportersystem zur simultanen Erfassung der Aktivität von NF- κ B (eCFP), NFAT (eGFP) und AP-1 (mCherry) und exprimieren den CD8 α / β -Co-Rezeptor. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS).

J-TPR-CD8-KO

Diese Variante der J-TPR-Zelllinie wurde mittels CRISPR-Cas9-Technologie so modifiziert, dass der CD8 α / β -Co-Rezeptor gezielt ausgeschaltet wurde. Der *Knock-out* ermöglicht die Untersuchung CD8-unabhängiger TCR-Signalwege und damit insbesondere die funktionelle Charakterisierung MHC-Klasse-I-restringierter TCRs ohne Einfluss korezeptorvermittelter Signalverstärkung. Die Kultivierung erfolgte unter identischen Bedingungen (RPMI-1640 mit 10 % FCS).

2.1.11 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 2 bis 4 aufgeführt.

Tabelle 2: Unkonjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Tü39	HLA-DR, -DP, -DQ (HLA-II)	Maus	Tü39	IgG2a	Prof. Cécile Gouttefangeas, Universität Tübingen
W6/32	HLA-Klasse-I (pan-HLA-I)	Maus	W6/32	IgG2a,	Biolegend, #307602
CD40	CD40	Maus	HB14	IgG1	Miltenyi, #130-094-133
TCRα/β	TCR α/β	Human	REA652	IgG1	Miltenyi, #130-119-618

Tabelle 3: Konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
CD3-PE/ Cyanine7	SK7	Maus	IgG1	1:20	BioLegend, #344816
CD4-FITC	A161A1	Ratte	IgG2b	1:20	BioLegend, #357406
CD4-PerCP	OKT4	Maus	IgG2b	1:20	BioLegend, #317432
CD154-PE	24-31	Maus	IgG1	1:20	BioLegend, #310805
IL-2-BV510	MQ1-17 H12	Ratte	IgG2a	1:20	BioLegend, #500338
IFNγ-APC	4S.B3	Maus	IgG1	1:20	BioLegend, #502511
TCRβ-APC/ Fire 750	H57-597	Armenischer Hamster	IgG1	1:50	BioLegend, #109246

Tabelle 4: Immunomonitoringpanel

Bezeichnung	Färbung	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-eFluor780	Lebend/tot	---	---	---	1:400	Invitrogen, #65-0865-14
CD56-PECy7	Extra-zellulär	HCD56	Maus	IgG2b	1:5	BioLegend, #318318
CD4-PerCP	Extra-zellulär	OKT4	Ratte	IgG1	1:100	Biolegend, #317432
CD8-FITC	Extra-zellulär	SK1	Maus	IgG1	1:100	Biolegend, #344704
CD154-APC	Extra-zellulär	24-31	Maus	IgG1	1:40	BioLegend, #310810
IL-2-BV510	Intra-zellulär	MQ1-17H12	Ratte	IgG1	1:100	BD, #9126834
IFNγ-PE	Intra-zellulär	B27	Maus	IgG1	1:200	BD, #554701
TNFα-PB	Intra-zellulär	MAb11	Maus	IgG1	1:200	BioLegend, #502920

2.1.12 Verwendete Software

Für die Datenerfassung, Analyse, Visualisierung und Dokumentation wurden die folgenden Softwareprogramme verwendet:

Adobe Acrobat Reader 9.0	Adobe Systems, San José, USA
BD FACSDiva™ 6.13	BD, Heidelberg
BioRender®	BioRender, Toronto, Kanada
EndNote™ 21	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo™ v10	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism® 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
MACSQuantify™ Software 2.13	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Microsoft Office LTSC 2024	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Prokaryoten

2.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden 90 μ l der Bakteriensuspension mit 30 ng Klonierungsvektor in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 Minute, um die Aufnahme der Plasmid-DNA zu ermöglichen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde etwa 300 μ l SOC-Medium zugegeben und die Suspension für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert.

Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4000 rpm für 5 Minuten. Das Zellpellet wurde in 50 μ l Medium resuspendiert und mithilfe eines sterilen Drigalski-Spatels auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Bei zu dichter Koloniebildung wurde ein Verdünnungsaustich auf einer weiteren LB-Ampicillin-Platte durchgeführt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.2 Kultivierung transformierter *E. coli* Zellen

Einzelne Klone wurden mithilfe einer sterilen Pipettenspitze von LB-Agarplatten aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (hier: 100 μ g/ml Ampicillin) inokuliert.

Für Minipräparationen von Plasmid-DNA erfolgte die Inkubation über circa 16 Stunden bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 250 rpm.

Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurde zunächst eine Vorkultur unter denselben Bedingungen für 8 Stunden angezogen. Anschließend wurden 200 μ l dieser Vorkultur in ein größeres Volumen LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und ebenfalls bei 37 °C für etwa 16 Stunden auf einem Schüttler (250 rpm) kultiviert.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen erfolgte mithilfe des peqGOLD Plasmid MiniPrep Kits (VWR) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [180]. Die Aufreinigung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die gewonnenen Plasmidpräparationen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Eukaryoten

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator kultiviert.

2.2.2.1 Passagierung eukaryotischer Zelllinien

Suspensionszellen wurden durch Entnahme eines volumenangepassten Anteils der Zellsuspension und anschließender Zugabe frischen Vollmediums passagiert.

Leicht adhärenente Zellen konnten durch mechanische Scherkräfte – beispielsweise durch seitliches Abklopfen des Kulturgefäßes – vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Stark adhärenente Zellen erforderten hingegen eine enzymatische Ablösung mittels Trypsin/EDTA-Lösung oder Accutase. Hierzu wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und der Zellrasen mehrfach mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer ausreichenden Menge Trypsin/EDTA oder Accutase bedeckt und für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Ablösung der Zellen konnte gegebenenfalls durch seitliches Abklopfen unterstützt werden.

Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens Vollmedium gestoppt. Nach Zentrifugation und Resuspension der Zellen in frischem Medium wurde die Kultivierung analog zu der von Suspensionszellen fortgeführt.

2.2.2.2 Isolation von PBMC, KM-MNC und leukämischen Blasten

PBMCs, KM-MNCs sowie leukämische Blasten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus antikoagulierten peripheren Blutproben, Knochenmarkpunktaten oder Nebenprodukten von Thrombozytapheresen isoliert. Hierzu wurde die hohe Dichte (1,077 g/ml) der verwendeten Biocoll-Separationslösung genutzt, welche aus einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer besteht.

Die Separationslösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und vorsichtig mit der mindestens 1:2 mit DPBS verdünnten Probe überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 800 × g für 30 Minuten ohne Beschleunigung und ohne Bremse. Dabei reichern sich PBMCs, KM-MNCs und Blasten entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Überstand (Plasma und Thrombozyten) und der Separationslösung an, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte sedimentieren.

Die mononukleäre Zellfraktion wurde vorsichtig entnommen, mit 50 ml DPBS gewaschen und bei 500 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit Zentrifugation bei 400 × g beziehungsweise 300 × g, jeweils für

10 Minuten. Die isolierten Zellen wurden abschließend in geeignetem Vollmedium resuspendiert.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Zur Bestimmung der Konzentration lebensfähiger Zellen in einer Zellsuspension wurde die Trypanblau-Färbung eingesetzt. Trypanblau dringt in Zellen mit geschädigter Membranintegrität ein und färbt diese blau, während intakte, lebende Zellen farblos bleiben. Die Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskopie.

Zur Zählung der Zellen kamen sowohl eine Neubauer-Zählkammer aus Glas als auch alternativ eine Einwegzählkammer (C-Chip) zum Einsatz. Die Neubauer-Zählkammer besitzt eine definierte Tiefe von 0,1 mm und enthält neun exakt vermessene Großquadrate, deren Einzelvolumen jeweils 0,1 μl beträgt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 0,1 %-Trypanblaulösung versetzt und anschließend in die Zählkammer pipettiert.

Die Lebendzellzahl wurde durch manuelle Zählung in zwei bis vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus dem Mittelwert der Zählungen wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Kammerfaktors von 10^4 die Zellzahl pro Milliliter berechnet.

Da Erythrozyten mikroskopisch nicht eindeutig von PBMCs beziehungsweise KM-MNCs zu unterscheiden sind, wurden gegebenenfalls vorhandene Erythrozyten in der Zählprobe durch eine Vorinkubation der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Erythrozyten-Lysepuffer für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Trypanblau versetzt und die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.4 Subklonierung von Zelllinien

Zur Isolierung monoklonaler Zellpopulationen wurde die Zellsuspension auf eine theoretische Zelldichte von 0,3 Zellen pro Kavität verdünnt und anschließend in eine 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät.

Nach mehrtägiger Inkubation konnten Einzelklone mittels Lichtmikroskopie identifiziert werden. Diese wurden stufenweise expandiert, zunächst in 24-, anschließend in 12- und 6-Well-Platten, bevor sie in Kulturflaschen überführt und weiterkultiviert wurden.

2.2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Nach der Ernte wurden die Zellen in 4 °C kaltem Einfriermedium resuspendiert. Dabei wurden 2×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 1 ml beziehungsweise bis zu 1×10^8

Zellen in 2 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und mithilfe eines Einfrierbehälters (Mr. Frosty™) kontrolliert bei -80 °C eingefroren.

Die kontrollierte Abkühlrate von etwa 1 °C pro Minute wurde durch das im Einfrierbehälter enthaltene Isopropanol gewährleistet, während das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) die Bildung intrazellulärer Eiskristalle verhinderte.

Für eine kurzfristige Lagerung konnten die kryokonservierten Zellen bei -80 °C aufbewahrt werden. Zur längerfristigen Konservierung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.6 Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad kurz angetaut. Sobald nur noch ein kleiner Teil des Mediums gefroren war, wurden die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem Auftaumedium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml resuspendiert.

Im Anschluss wurden die Zellen bei $300 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Die Zellpellets wurden anschließend in frischem Vollmedium aufgenommen und in geeignete Kulturgefäße überführt.

2.2.2.7 Expansion impfspezifischer T-Zellen durch Peptidstimulation

Zur Anreicherung und Expansion impfspezifischer T-Zellen wurden PBMCs nach dem Auftauen mit immunogenen Peptiden stimuliert. Abhängig von der Art der Stimulation erfolgte die Kultivierung entweder in *48-Well*- oder *96-Well*-Flachbodenplatten. Während *48-Well*-Platten für die Stimulation mit impfstoffspezifischen Peptiden verwendet wurden, dienten *96-Well*-Platten der Kontrolle durch virusspezifische Peptivatoren (CMV, Adenovirus, EBV).

Für die impfspezifische Stimulation wurden pro *Well* $2,5\text{--}3 \times 10^6$ PBMCs in einem Gesamtvolumen von 250 μl Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden mit $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse-I- sowie $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ MHC-Klasse-II-Peptiden stimuliert. Zur Kontrolle der funktionellen Reaktivität wurden virusspezifische Peptivatoren eingesetzt.

An den Tagen 2, 5 und 7 wurden Interleukin-2 (IL-2, 10 IU/ml) und Interleukin-7 (IL-7, 10 ng/ml) zur Kultur zugegeben, um die Proliferation der T-Zellen zu fördern. Das Medium wurde regelmäßig und bei Bedarf ersetzt, insbesondere bei pH-Verschiebungen, die sich durch eine Gelbfärbung des Mediums bemerkbar machten.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 12 bis 14 Tagen. Ab Tag 9 wurde auf eine Teilung der Kultur verzichtet, da dies eine unspezifische Reaktivierung der T-Zellen begünstigen könnte. Die Zellmorphologie sowie der pH-Wert wurden über den gesamten Zeitraum hinweg regelmäßig kontrolliert.

Die expandierten Zellen wurden je nach experimenteller Zielsetzung für immunologische Analysen wie das Immunomonitoring mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) und Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.3.1.1), für Einzelzellsequenzierungen oder für funktionelle Validierungen eingesetzt. Die Isolierung spezifischer Zellpopulationen erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (MACS) oder durch Einzelzellsortierung.

2.3 Analytische Verfahren

2.3.1 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die Immunfluoreszenzfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse wurde in dieser Arbeit für verschiedene Fragestellungen eingesetzt, darunter die Quantifizierung definierter Zellpopulationen, der qualitative wie quantitative Nachweis der Antigenexpression auf Zelloberflächen, der Nachweis intrazellulärer Antigene und Zytokine sowie die Überprüfung der Antikörperbindung an exprimierte Zielantigene.

Die durchflusszytometrische Charakterisierung basiert auf der Detektion der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von Licht (FSC und SSC), welche Rückschlüsse auf Zellgröße und Granularität erlaubt, sowie auf der Analyse fluorochrommarkierter Antikörper oder Reagenzien. Die Fluorochrome werden durch laserbasiertes Licht angeregt und emittieren Fluoreszenzsignale, die in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen detektiert werden und Aussagen zur Expression oder Bindungseigenschaften erlauben.

Pro Ansatz wurden $2,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Nach Ernte und Lebendzellzählung wurden die Zellen in PBSE-Puffer auf eine Konzentration von $1,25 \times 10^6$ bis 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Färbung wurden 200 μ l Zellsuspension in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bei $650 \times g$ für 2 Minuten zentrifugiert.

Zur Vitalitätskontrolle wurden tote Zellen mithilfe eines LIVE/DEAD™ *Fixable Dead Stain Kits* markiert. Hierzu wurde das Zellpellet in 50 µl Färbelösung in PBSE-Puffer resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das darin enthaltene aminreaktive Fluorochrom bindet extrazelluläre Amine lebender Zellen. Bei toten Zellen mit kompromittierter Membranintegrität dringt es zusätzlich zu intrazellulären Aminen vor, was zu einer erhöhten Fluoreszenz führt und so die Exklusion dieser Zellen im Analyse-*Gating* ermöglicht.

Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Fleboy-Puffer (bei humanen Primärzellen) oder FACS-Puffer (bei Zelllinien) gewaschen (jeweils 2 Minuten bei $650 \times g$ in 200 µl). Der FACS-Fleboy-Puffer enthielt humane Immunglobuline zur Blockade von Fc-Rezeptoren und wurde nur bei der Verwendung nicht-humaner Antikörper eingesetzt, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Zur Oberflächenfärbung wurde das Zellpellet mit 50 µl Antikörperlösung in dem jeweiligen Puffer resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten.

War der verwendete Primärantikörper fluorchromkonjugiert und keine intrazelluläre Färbung geplant (vgl. Abschnitt 2.3.1.1), wurde das Zellpellet anschließend in 80–200 µl FACS-Puffer mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. PFA induziert eine Proteinvernetzung, die den Verlust von Fluoreszenzsignalen über mehrere Tage verhindert.

Wurden Fluorochrome mit überlappenden Emissionsspektren eingesetzt, war eine Kompensation erforderlich, um die spektrale Überlappung zu korrigieren. Diese erfolgte mithilfe von Mikropartikeln (AbC- beziehungsweise ArC-Beads, Invitrogen), die mit den jeweils verwendeten Fluorochromen markiert wurden. Für die Kompensation wurden 20 µl Mikropartikel mit 1–5 µl Antikörperlösung beziehungsweise 0,2 µl aminreaktivem Reagenz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer überführt.

Alle Experimente wurden unter Einbeziehung geeigneter Negativ-, Positiv- und FMO-Kontrollen (Fluoreszenz-Minus-Eins) durchgeführt. FMO-Kontrollen dienten der Festlegung realistischer Gates, insbesondere bei schwach positiven Populationen, und ermöglichten die Unterscheidung spezifischer Fluoreszenzsignale vom Hintergrund. Die Messungen erfolgten an einem BD FACSCanto™ II oder BD LSRII Fortessa™. Die Auswertung der Daten wurde mithilfe der Softwarelösungen BD FACSDiva™ und FlowJo™ durchgeführt.

2.3.1.1 FACS-basierte Detektion intrazellulärer Zytokine

Zur Detektion intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen nach *in vitro* Stimulation (siehe Abschnitt 2.2.2.7) mit Sekretionsinhibitoren behandelt, die die Exozytose unterbinden und so eine Akkumulation von Zytokinen im Zytoplasma ermöglichen. Dies erlaubt anschließend eine spezifische intrazelluläre Färbung der angereicherten Zytokine mittels durchflusszytometrischer Analyse.

Nach der zuvor beschriebenen Oberflächenfärbung zur Identifikation distinkter Zellpopulationen wurden die Zellen in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Reagenz (BD Biosciences) resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das im Reagenz enthaltene Paraformaldehyd (PFA) fixiert die Zellen und konserviert sowohl die intrazellulären Antigene als auch die Zellmorphologie. Gleichzeitig führt das enthaltene Saponin zu einer selektiven Permeabilisierung der Zellmembran.

Anschließend wurden die Zellen zweimal für jeweils 2 Minuten bei 650 × g in 200 µl Perm/Wash-Puffer zentrifugiert. Dieser saponinhaltige Puffer gewährleistet die Aufrechterhaltung des permeabilisierten Zustands während der intrazellulären Antikörperfärbung.

Das Zellpellet wurde anschließend mit 50 µl Antikörperlösung in Perm/Wash-Puffer resuspendiert und 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Perm/Wash-Puffer wurde das Zellpellet in 80–200 µl FACS-Puffer mit 1 % Paraformaldehyd aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Zur quantitativen Auswertung der Peptidreaktivität wurde ein antigenspezifischer Stimulationsindex (ASI-MCR, *antigen-specific index – multi cytokine response*) berechnet, der die kombinierte Aktivierung der Zellen in Relation zur Hintergrundbedingung (Negativkontrolle DMSO) angibt. Der ASI ergibt sich als Summe der Einzelhäufigkeiten von Zellen, die nach Peptidstimulation mindestens einen der gemessenen Aktivierungsmarker (z. B. IFN γ , TNF α , CD154, IL-2) exprimierten, geteilt durch den entsprechenden Summenwert in der Negativkontrolle. Dadurch können sowohl mono- als auch polyfunktionelle T-Zellantworten integrativ erfasst und mit nicht-spezifischen Hintergrundsignalen verrechnet werden.

2.3.1.2 Quantifizierung der HLA-Oberflächendichte mittels Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Bestimmung der Oberflächendichte von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf leukämischen B-Zell-Blasten wurde eine indirekte Durchflusszytometrie mithilfe des QIFIKITs (Dako) durchgeführt. Die Analyse

erfolgte an Kryopräparaten einer repräsentativen Kohorte von 15 pädiatrischen Patientinnen und Patienten mit ALL.

Die Methode basiert auf dem Prinzip der gleichzeitigen Färbung von Mikropartikelpopulationen mit definierter Anzahl an Bindestellen für murine IgG-Antikörper (*calibration beads*, Kalibrierungspartikel) sowie der zu analysierenden Zellen mit einem unkonjugierten Primärantikörper. Die Fluoreszenzintensitäten der Mikropartikel dienen der Erstellung einer Standardkurve, anhand derer die absolute Antigendichte auf den Zellen bestimmt werden kann.

Für die HLA-Klasse-I-Quantifizierung wurde der pan-HLA-I-Antikörper W6/32, für die Bestimmung der HLA-Klasse-II-Dichte der gegen HLA-DR, -DP, -DQ gerichtete Antikörper Tü39 eingesetzt. Als Isotypkontrollen dienten entsprechende unkonjugierte murine IgG-Antikörper. Alle Antikörper wurden in sättigender Konzentration verwendet.

Nach Ausschluss toter Zellen mittels LIVE/DEAD™ eFluor780 (Invitrogen) wurden die Proben zusätzlich mit CD45 (BrilliantViolet711), CD3 (Pacific Blue), CD19 (APC) und CD22 (BrilliantViolet605) gefärbt, um ein präzises *Gating* auf ALL-Blasten zu ermöglichen.

Die Färbung der Kalibrationspartikel erfolgte parallel unter identischen Bedingungen mit dem gleichen FITC-konjugierten polyklonalen Sekundärantikörper (Dako), der auch zur Detektion der Zellen verwendet wurde. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die Messungen erfolgten auf einem BD LSRFortessa™. Die Berechnung der HLA-Dichte erfolgte gemäß Herstellerangaben anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Kalibrationspartikel und der jeweiligen Zellpopulationen.

2.4 Präparative Methoden

In diesem Kapitel werden die experimentellen Verfahren zur Isolierung, Expansion, Klonierung und funktionellen Analyse antigenspezifischer T-Zellen beschrieben. Zunächst wird die selektive Aktivierung und Anreicherung spezifischer

T-Zellpopulationen dargestellt, gefolgt von der Etablierung klonaler Zellpopulationen durch Einzelzellsortierung (FACS) oder Limitierungsverdünnung. Im Anschluss wird die funktionelle Testung ausgewählter T-Zellen in sogenannten *Blasten-Challenge*-Ansätzen erläutert. Den Abschluss bildet die Beschreibung der CRISPR-Cas9-vermittelten orthotopen TCR-Austausch-Methode, einschließlich des Designs geeigneter DNA-Templates, der elektroporativen Transfektion und der anschließenden Anreicherung transgener Zellen.

2.4.1 Antigen-spezifische Aktivierung und Expansion von T-Zellen

Zur selektiven Anreicherung impfstoffreaktiver T-Zellen wurden PBMCs zunächst *in vitro* mit den jeweiligen Impfpeptiden stimuliert. Die Stimulation diente sowohl der Aktivierung als auch der Expansion antigenspezifischer T-Zellen und bildete die Grundlage für nachfolgende Selektion, funktionelle Testung oder Klonierung.

Die PBMCs wurden in einem definierten T-Zell-Medium (IMDM mit 7,5 % Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 50 μM β -Mercaptoethanol) kultiviert. Die initiale Stimulation erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Peptide in folgender Konzentration: 10 $\mu\text{g/ml}$ für MHC-Klasse-II-Peptide und 1 $\mu\text{g/ml}$ für MHC-Klasse-I-Peptide. Die Kultivierung wurde in 24-Well-Platten durchgeführt, wobei $1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen pro Well eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 .

Je nach experimenteller Zielsetzung erfolgte nach sechs bis acht Tagen eine Restimulation mit dem jeweiligen Impfpeptid unter identischen Bedingungen, um die Aktivierung aufrechtzuerhalten und die Frequenz impfstoffspezifischer T-Zellen zu erhöhen. Die Kultur wurde regelmäßig mit frischem Medium und Interleukin-2 (IL-2, 150 IU/ml) ergänzt, um die Expansion der aktivierten T-Zellen zu unterstützen.

Für den Fall, dass die stimulierten T-Zellen anschließend kloniert werden sollten, wurde nach der Vereinzelnung zusätzlich Phytohämagglutinin-L (PHA-L, 1 $\mu\text{g/ml}$) zur Unterstützung der Proliferation eingesetzt. PHA-L wurde ausschließlich im Rahmen der Klonierung und nicht während der allgemeinen Expansion vor der Selektion verwendet.

Nach der primären Expansion wurden die T-Zellen entweder zur magnetischen Selektion (MACS), zur Einzelzellsortierung (FACS) oder zur Klonierung (Limitierungsverdünnung oder Einzelzellsortierung) verwendet, abhängig von der jeweiligen Zielsetzung der Experimente.

2.4.2 Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen

Zur gezielten Isolierung antigenspezifischer T-Zellen wurden zwei Strategien angewendet, die auf der Detektion funktioneller Aktivierungsmarker nach *in vitro* Stimulation mit impfstoffspezifischen Peptiden basierten. Entweder wurden IFN γ -sezernierende Zellen über den IFN γ Secretion Assay angereichert oder CD154-exprimierende Zellen durch spezifische Oberflächenfärbung identifiziert. In beiden Fällen erfolgte zusätzlich eine Markierung zur Unterscheidung von CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -T-Zellen.

Die Selektion IFN γ -positiver Zellen erfolgte mithilfe des IFN γ *Secretion Assay - Detection Kit*. PBMCs wurden dazu für 3 bis 16 Stunden mit dem jeweiligen Impfpeptid restimuliert. Anschließend wurde ein Anti-IFN γ -*Catch*-Reagenz appliziert, das sezerniertes IFN γ an der Zelloberfläche band. Nach einer weiteren Inkubation wurden die IFN γ^{+} -Zellen mittels fluorochromkonjugierter Antikörper detektiert. Für eine magnetische Anreicherung wurden zusätzlich Anti-FITC-Mikrobeads zugesetzt und die Zellen unter Verwendung von MS- oder LS-MACS-Säulen isoliert.

Die Detektion CD154 $^{+}$ -T-Zellen erfolgte hingegen ohne magnetische Selektion. PBMCs wurden für 4 bis 16 Stunden mit dem jeweiligen Impfpeptid stimuliert, um die transiente Expression von CD154 auf aktivierten T-Zellen zu induzieren. Anschließend wurde ein biotinylierter monoklonaler Anti-CD154-Antikörper appliziert, gefolgt von fluorochromkonjugiertem Streptavidin zur Detektion.

In beiden Fällen wurden die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 gefärbt, um die jeweilige Subpopulation der reaktiven T-Zellen (CD4 $^{+}$ beziehungsweise CD8 $^{+}$) zu differenzieren. Die angereicherten Zellen wurden anschließend für eine Einzelzellsortierung oder zur Etablierung klonaler T-Zellpopulationen verwendet.

2.4.3 Etablierung klonaler T-Zellpopulationen

Zur Etablierung klonaler T-Zellpopulationen wurden zuvor angereicherte antigenspezifische CD4 $^{+}$ - oder CD8 $^{+}$ -T-Zellen entweder durch Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie oder über Limitierungsverdünnung unter klonogenen Bedingungen in Kultur überführt. Dabei kamen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: die gezielte Isolation aktivierter T-Zellen anhand der Induktion von

CD154 oder IFN γ sowie die statistische Vereinzelung stimulierter PBMCs durch definierte Zellverdünnung (Limitierungsverdünnung).

Für die Einzelzellsortierung wurden die aktivierten Zielzellen direkt in vorbereitete 96-*Well*-Kulturplatten überführt, wobei pro *Well* exakt eine Zelle eingebracht wurde. Bei der Limitierungsverdünnung wurden die stimulierten PBMCs so weit verdünnt, dass statistisch ein bis drei Zellen pro *Well* enthalten waren.

Zur Unterstützung der klonogenen Expansion wurden die Kulturplatten zuvor mit bestrahlten *Feeder*-Zellen vorbereitet. Hierfür wurden pro *Well* $0,15 \times 10^6$ allogene PBMCs (Frischblut oder *Buffy Coats* von drei bis vier gesunden Spenderinnen und Spendern), bestrahlt mit 60 Gy, sowie $0,015 \times 10^6$ LG2-EBV-Zellen, bestrahlt mit 200 Gy, eingebracht und gemeinsam als Zellgemisch vorgelegt. Die Bestrahlungsdosis wurde so ausgewählt, dass sie nicht unmittelbar letal für die jeweiligen Zellen war, jedoch eine weitere Proliferation verhindert.

Die Kultivierung der Einzelzellen *in vitro* erfolgte in T-Zell-Medium, ergänzt mit Interleukin-2 (IL-2, 150 IU/ml) und Phytohämagglutinin-L (PHA-L, 1 μ g/ml), und wurde über mehrere Wochen fortgeführt. Ab dem siebten Tag nach Zellkulturansatz wurde das Medium regelmäßig – etwa alle zwei bis drei Tage – durch frisches IL-2-haltiges Medium ersetzt, um die Proliferation zu unterstützen. Zur Förderung der langfristigen Expansion wurden im Zweiwochenrhythmus frische *Feeder*-Zellen hinzugegeben. Die entstehenden Klone wurden regelmäßig auf ihr Wachstum kontrolliert und bei Erreichen ausreichender Zellzahlen für nachfolgende funktionelle Analysen, Durchflusszytometrie oder Einzelzellsequenzierung verwendet.

2.4.4 Funktionelle Testung antigenspezifischer T-Zellen in der *Blasten-Challenge*

Zur funktionellen Überprüfung impfstoffinduzierter T-Zellen wurden ausgewählte autologe T-Zellklone mit patienteneigenen leukämischen Blasten kokultiviert. Ziel dieses sogenannten *Blasten-Challenge*-Ansatzes war es, die Fähigkeit der T-Zellen zur Erkennung autolog präsentierter Impfpeptide sowie die HLA-Restriktion der TCR-vermittelten Reaktivität zu untersuchen.

Verwendet wurden kryokonservierte Blasten, die im Rahmen eines individuellen pädiatrischen ALL-Heilversuchs gewonnen und konserviert worden waren. Nach dem Auftauen wurden sie in PBS aufgenommen, bei $300 \times g$ für 10 Minuten

zentrifugiert, in T-Zell-Medium resuspendiert, erneut gewaschen und anschließend ausgezählt. Die Blastenpopulation wurde in zwei Hälften aufgeteilt: Eine Hälfte wurde mit dem jeweiligen Impfpeptid beladen und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert, die zweite Hälfte blieb unbeladen und diente als Negativkontrolle.

Zur Kontrolle der HLA-abhängigen T-Zellaktivierung wurden Teilfraktionen beider Bedingungen zusätzlich mit blockierenden monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Klasse-I (W6/32) beziehungsweise HLA-Klasse-II (Tü39) für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Insgesamt wurden vier Versuchsbedingungen getestet: Blasten mit und ohne Peptidbeladung, jeweils mit und ohne HLA-Blockade. Die Blockade diente als funktionelle Negativkontrolle zur Bestätigung der TCR-vermittelten, HLA-abhängigen Antigenerkennung: Eine ausbleibende T-Zellaktivierung trotz Peptidbeladung nach HLA-Blockade weist auf eine spezifische, HLA-restringierte Reaktivität hin.

Anschließend wurden die T-Zellklone mit den vorbehandelten beziehungsweise unbehandelten Blasten im Verhältnis 1:1 in 96-*Well*-Platten zusammengeführt und über Nacht (etwa 16 Stunden) kokultiviert. Brefeldin A wurde in den letzten Stunden der Kokultur hinzugegeben, um die intrazelluläre Anreicherung von Zytokinen durch Blockade der Proteinsekretion zu ermöglichen. Die Aktivierung der T-Zellen wurde im Anschluss durch intrazelluläre Zytokinfärbung erfasst. Als funktionelle Marker dienten TNF α , IFN γ , IL-2 und CD154. Die Analyse erfolgte mittels mehrparametrischer, fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (Panel siehe Abschnitt 2.1.11).

2.4.5 Indexsortierung peptidaktivierter T-Zellen zur TCR-Sequenzierung

Zur Einzelzellsequenzierung von T-Zell-Rezeptoren wurden antigenspezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen anhand der Expressionsmarker CD154 beziehungsweise IFN γ identifiziert und als Einzelzellen direkt in 96-*Well*-PCR-Platten sortiert, sodass pro *Well* exakt eine Zelle eingebracht wurde. Die Auswahl dieser Zielzellen basierte auf der funktionellen Reaktivität nach Peptidstimulation und erfolgte durch Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie.

Nach einer vorherigen Stimulation mit Impfpeptiden und gegebenenfalls durchgeführter magnetischer Voranreicherung wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellsuspension in PBS auf 1×10^7 bis 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die extrazelluläre Färbung umfasste fluorochromkonjugierte Antikörper gegen CD3,

CD4, CD8 sowie entweder CD154 oder IFN γ . Die Proben wurden bis zur Sortierung dunkel bei 4 °C aufbewahrt.

Die Einzelzellsortierung erfolgte am BD FACSAria™ III. Die Zielzellen wurden in vorbereitete 96-Well-PCR-Platten sortiert, die zuvor mit 10 μ l 1 \times OneStep RT-PCR-Puffer (Qiagen) befüllt worden waren, um eine unmittelbare RNA-Stabilisierung zu gewährleisten. Die Selektion beruhte auf einer standardisierten *Gating*-Strategie: Nach Ausschluss von Zelltrümmern und Doppelzellereignissen (FSC/SSC, *Singlet-Gating*) wurden lebende Zellen mittels Viabilitätsfarbstoff identifiziert.

Innerhalb der CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellpopulationen erfolgte anschließend die Auswahl CD154- beziehungsweise IFN γ -positiver Zellen. Die *Gating*-Strategie ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt.

Eine Übersicht zu den jeweils analysierten Patientinnen und Patienten mit Angabe der Diagnose, HLA-Typisierung, verabreichten Impfpptide, deren HLA-Restriktion sowie den im Immunmonitoring beobachteten Reaktivitäten ist in Tabelle 5 Übersicht der Patientinnen und Patienten der IVAC-ALL-1-Studie.

Für jede Patientin beziehungsweise jeden Patienten sind die Diagnose, die vollständige HLA-Typisierung sowie die im individuellen Impfstoff enthaltenen Peptide (Aminosäuresequenz / Gen / Mutation), deren vorhergesagte HLA-Restriktion und das Ergebnis der funktionellen Immunantwort im Immunmonitoring dargestellt. Eine Immunantwort wurde anhand des Stimulation Index (SI) nach ex vivo-Restimulation definiert. Potenzielle CD8⁺-Epitope innerhalb längerer, ursprünglich MHC-Klasse-II-prädizierter Peptide wurden zusätzlich aufgeführt, sofern sie bioinformatisch vorhergesagt wurden.dargestellt.

Tabelle 5 Übersicht der Patientinnen und Patienten der IVAC-ALL-1-Studie.

Für jede Patientin beziehungsweise jeden Patienten sind die Diagnose, die vollständige HLA-Typisierung sowie die im individuellen Impfstoff enthaltenen Peptide (Aminosäuresequenz / Gen / Mutation), deren vorhergesagte HLA-Restriktion und das Ergebnis der funktionellen Immunantwort im Immunmonitoring dargestellt. Eine Immunantwort wurde anhand der Stimulation Index (SI) nach ex vivo-Restimulation definiert. Potenzielle CD8⁺-Epitope innerhalb längerer, ursprünglich MHC-Klasse-II-prädizierter Peptide wurden zusätzlich aufgeführt, sofern sie bioinformatisch vorhergesagt wurden.

Patient	Diagnose	HLA-Typisierung		Impfpeptid (Sequenz / Gen / Mutation)		HLA-Restriktion	Immunantwort ja/nein
		Allel 1	Allel 2				
ALL-0101	pro-B-ALL (MLL+)	A*03:01	A*24:31	Peptid 1	LPGGREGLQL [ZCCHC3 / D269fs]	C*03:03	nein
		B*15:01	B*27:05	Peptid 2	SDRQVWDLDRGVQMR [ZCCHC3 / D269fs]	Klasse II	ja
		C*03:03	C*01:02	Peptid 3	GREGLQLVQGAAQDM [ZCCHC3 / D269fs]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*02:01				
		DPB1*04:02	DPB1*09:01				
		DQA1*03:01	DQA1*03:01				
		DQB1*03:02	DQB1*05:01				
		DRB1*04:01	DRB1*10:01				
		DRB3*02:02	DRB4*01:03				
ALL-0104	c-ALL	A*11	A*03	Peptid 1	GIPFIETSVK [KRAS / A146V]	A*11:01	nein
		B*51	B*07	Peptid 2	LTFGYQFQR [SETD2 / D1665G]	A*11:01	nein
		C*15	C*07	Peptid 3	HAFRPDYL [RECQL5 / D168A]	B*51:01	nein
		DPA1*01:03	DPA1*02:01	Peptid 4	IPFIETSVKTRQRVE [KRAS / A146V]	Klasse II	ja
		DPB1*01:01	DPB1*04:01	Peptid 5	QEIFHSKWRRPSEGR [RAI1 / R1160W]	Klasse II	nein
		DQA1*03:01	DQA1*05:01				
		DQB1*03:02	DQB1*05:03				
		DRB1*04:04	DRB1*14:01				
		DRB3*01:01	DRB4*01:03				

ALL-0105	c-ALL	A*01:01	A*03:01	Peptid 1	TLRAVGLLY [MED24 / E766G]	A*03:01	nein
		B*08:01	B*57:01	Peptid 2	NEKLDQLYGSFDDPN [HOOK1 / D233Y]	Klasse II	ja
		Cw*07:01	Cw*06:02	Peptid 3	NRSPNGPISKEFQVG [L3MBTL4 / M188]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	SGPYTAKADNGMWY [FGL1 / T279A]	Klasse II	ja
		DPB1*02:01	DPB1*04:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 4			
		DQA1*02:01	DQA1*03:01	TAKADNGMW		B*57:01	
		DQB1*02:01	DQB1*0303x	YTAKADNGMW		B*57:01	
		DRB1*03:01x	DRB1*07:01	KADNGMWY		A*01:01	
		DRB4*01:03	DRB4*01:03				
ALL-0106	pro-B-ALL (MLL+)	A*03:01	A*33:01	Peptid 1	KKNPDASVKL [SP100 F712L]	C*08:02	ja
		B*40:01	B*14:02	Peptid 2	SVKLSEFLK [SP100 F712L]	A*33:01	ja
		C*07:02	C*08:02	Peptid 3	DASVKLSEF [SP100 F712L]	B*15:01	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	KNPDASVKLSEFLKK [SP100 F712L]	Klasse II	ja
		DPB1*04:01	DPB1*06:01				
		DQA1*01:03	DQA1*05:01				
		DQB1*06:04	DQB1*02:01				
		DRB1*13:02	DRB*03:01				
DRB3*01:01	DRB3*02:02						
ALL-0107	pro-B-ALL (MLL+)	A*01:01	A*02:01	Peptid 1	ARDIMSGSNY [FLT3 N839G]	A*01:01	ja
		B*38:01	B*57:01	Peptid 2	IMSGSNYVV [FLT3 N839G]	A*02:01	ja
		C*06:02	C*12:03	Peptid 3	VFTREVAVLFKLIQ [ASAP3 A111V]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	AVFTREVAVL [ASAP3 A111V]	A*02:01	ja
		DPB1*04:01	DPB1*124:01	Peptid 5	VLFKLIQNL [ASAP3 A111V]	A*02:01/C*12:03	ja
		DQA1*01:02	DQA1*05:05	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 3			
		DQB1*03:01	DQB1*06:02	FTREVAVLF		B*57:01/C*12:03	
		DRB1*13:03	DRB1*15:01				
		DRB3*01:01	DRB5*01:01				

ALL-0112	pre-B-ALL	A*02:01	A*24:02	Peptid 1	DYELGRELL [FANCI V290L]	A*24:02	ja
		B*07:02	B*07:02	Peptid 2	APEYRVILDANNLTV [PRPF31 V94L]	Klasse II	nein
		C*07:02	C*07:02	Peptid 3	MKVLGVQPPLLQSTI [EXOC4 R574P]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	LLSVASQTL [CIC A320S]	A*02:01	ja
		DPB1*04:01	DPB1*04:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 3			
		DQA1*01:02	DQA1*01:02	KVLGVQPPL		A*02:01	
		DQB1*06:02	DQB1*06:02	KVLGVQPPLL		A*02:01 / A*24:02	
		DRB1*15:01	DRB1*15:01	MKVLGVQPPL		A*02:01	
		DRB5*01:01	DRB5*01:01	VLGVQPPL		A*02:01	
ALL-0201	BAL	A*01:01	A*03:01	Peptid 1	RTLREHLAK [GNB2 / G53E]	A*03:01	nein
		B*08:01	B*35:03	Peptid 2	RVAQVFFLK [DUSP1 / A115V]	A*03:01	nein
		C*04:01	C*07:01	Peptid 3	ILENQEKSLK [BRCA2 / I2297L]	A*03:01	nein
		DPA1*01:03	DPA1*02:01	Peptid 4	RTRRTLREHLAKIYA [GNB 2 / G53E]	Klasse II	ja
		DPB1*04:01	DPB1*09:01	Peptid 5	SSDFGNHSTSHLMQS [OGT / P569S]	Klasse II	ja
		DQA1*05:01	DQA1*05:05				
		DQB1*02:01	DQB1*03:01				
		DRB1*03:01	DRB1*11:01				
		DRB3*01:01	DRB3*02:02				
ALL-0401	pre-B-ALL	A*03:01	A*26:01	Peptid 1	NGAKWNPPTGTINDF [AEBP1 / R854P]	Klasse II	ja
		B*44:03	B*47:01	Peptid 2	EILPHTPMLTHFPTV [HM13 / R358M]	Klasse II	ja
		C*06:02	C*14:03	Peptid 3	WSDEKDGGDHILPF [SORL1 / C1403G]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 2			
		DPB1*03:01	DPB1*04:02	ILPHTPMLTH		A*03:01	
		DQA1*01:01	DQA1*03:03				
		DQB1*03:02	DQB1*06:03				
		DRB1*04:05	DRB1*15:01				
		DRB4*01:03	DRB4*01:03				

ALL-0402	c-ALL	A*01:01	A*02:01	Peptid 1	YSKHMNHRY [ZEB2 / Q1072K]	A*01:01	ja
		B*08:01	B*27:05	Peptid 2	ELFRRNVSDL [CD19 / W124R]	A*02:01	ja
		C*01:02	C*07:01	Peptid 3	SHSGSYSKHMNHRY [ZEB2 / Q1072K]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	KLVVVGAVGVGKSAL [KRAS / G12V]	Klasse II	ja
		DPB1*02:01	DPB1*04:01	Peptid 5	ARSGDNPMYWGHS [ABHD12 / V240M]	Klasse II	ja
		DQA1*01:01	DQA1*05:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 5			
		DQB1*02:01	DQB1*05:01	PMYWGHS		A*02:01	
		DRB1*01:01	DRB1*03:01	NPMYWGHS		B*08:01	
		DRB3*01:01	DRB3*01:01	ARSGDNPMY		B*27:05	
ALL-0403	c-ALL	A*02:01	A*02:01	Peptid 1	KIPLVLSSLVTPFLN [OR6J1 / V279L]	Klasse II	ja
		B*40:01	B*51:01	Peptid 2	KAFKYSSIL [ZNF93 / R326S]	C*03:04/C*15:02	ja
		C*03:04	C*15:02	Peptid 3	KAFKYSSI [ZNF93 / R326S]	B*51:01	ja
		DPA1*01:03	DPA1*02:01	Peptid 4	LVTPFLNPF [OR6J1 / V279L]	A*02:01	ja
		DPB1*01:01	DPB1*03:01	Peptid 5	KIPLVLSSL [OR6J1 / V279L]	A*02:01	nein
		DQA1*01:02	DQA1*03:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 1			
		DQB1*03:02	DQB1*06:04	KIPLVLSSL		A*02:01	
		DRB1*04:04	DRB1*13:02	KIPLVLSSLV		A*02:01	
		DRB3*03:01	DRB4*01:03	VLSSLVTPFL		A*02:01	
				IPLVLSSLV		B*51:01	
				IPLVLSSL		B*51:01	
				LSSLVTPFL		C*03:04/C*15:02	

ALL-0405	pre-B-ALL	A*01:01	A*11:01	Peptid 1	YRFVQGKYW [SPOP D130Y]	B*27:02/C*07:01	ja
		B*08:01	B*27:02	Peptid 2	TLDSVQKLPK [TCEB3 N473T]	A*11:01	ja
		C*07:01	C*07:01	Peptid 3	PAGVSSAIIIPVLRKT [URB1 V1294I]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*02:01	Peptid 4	n/a	n/a	
		DPB1*01:01	DPB1*04:02	Peptid 5	DSKSTGKTLDSVQKL [TCEB3 N473T]	Klasse II	ja
		DQA1*05:01	DQA1*05:05				
		DQB1*02:01	DQB1*03:01				
		DRB1*03:01	DRB1*11:01				
	DRB3*01:01	DRB3*02:02					
ALL-0407	c-ALL	A*03:01	A*24:02	Peptid 1	DGDYGEHGYRHDI [RBM5 D86G]	Klasse II	ja
		B*40:02	B*44:02	Peptid 2	IEFMYKSGNL [LMF2 P487S]	B*40:02 / B*44:02	nein
		C*02:02	C*05:01	Peptid 3	EFMYKSGNL [LMF2 P487S]	A*24:02	nein
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	GEHGYRHDI [RBM5 D86G]	B*40:02 B*44:02	ja
		DPB1*02:01	DPB1*02:01		Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 1		
		DQA1*01:03	DQA1*05:05		GEHGYRHDI	B*40:02 B*44:02	
		DQB1*03:01	DQB1*06:03				
		DRB1*11:01	DRB1*13:01				
			DRB3*02:02	DRB3*02:02			

ALL-0412	c-ALL	A*01:01	A*26:01	Peptid 1	ILDTAGREEY [NRAS Q61R]	A*01:01	ja
		B*07:02	B*08:01	Peptid 2	LEEEIPSRKRALIES [ABI1 G15R]	Klasse II	ja
		C*07:01	C*12:03	Peptid 3	PAPSAAPYGLALSPV [MLXIP C521Y]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*02:01	Peptid 4	AELHLFRYDAPETV [PLA2G6 N601Y]	Klasse II	ja
		DPB1*01:01	DPB1*02:01	Peptid 5	ITRAKEKPQQVEALY [MRPS2 R264P]	Klasse II	nein
		DQA1*02:01	DQA1*05:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 2			
		DQB1*02:01	DQB1*02:02	IPSRKRALI		B*07:02 / B*08.01	
		DRB1*03:01	DRB1*07:01	IPSRKRAL		B*07:02 / B*08.01	
		DRB3*01:01	DRB4*01:01	EIPSRKRAL		B*08:01	
				EEIPSRKRAL		A*26:01	
				Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 3			
				APYGLALSPV		B*07:02	
				APSAAPYGL		B*07:02	
				SAAPYGLAL		B*08:01	
		APSAAPYGLA		C*12:03			
				B*07:02			
				B*07:02			
ALL-0413	T-ALL	A*03:01	A*24:02	Peptid 1	GLKTDSRQVK [SCYL1 E764K]	A*03:01	nein
		B*48:01	B*51:01	Peptid 2	TGRTTTDYELEEMLE [STX2 D162Y]	Klasse II	ja
		C*08:01	C*12:03	Peptid 3	EDNWEGLKTDSRQVK [SCYL1 E764K]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 2			
		DPB1*02:01	DPB1*04:01	TDYELEEML		A*24:02	
		DQA1*01:01	DQA1*03:03				
		DQB1*03:01	DQB1*05:01				
		DRB1*01:01	DRB1*04:01				
		DRB4*01:02					

ALL-0501	c-ALL	A*02:01	A*32:01	Peptid 1	FLSQHPLEEL [DRP2 F175L]	A*02:01	ja
		B*40:02	B*55:01	Peptid 2	LEHFGRRFPL [DPH2R198H]	B*40:02	ja
		C*02:02	C*03:03	Peptid 3	ILYQTPDFLVYWTIA [TBC1D9 S72F]	Klasse II	ja
		DPA1*01:03	DPA1*01:03	Peptid 4	KLVVVGADGVGKSAL [NRAS G12D]	Klasse II	ja
		DPB1*03:01	DPB1*04:01	Peptid 5	SKSFVTPFQSHFVRV [BLM P173F]	Klasse II	ja
		DQA1*01:01	DQA1*03:01	Potenzielle CD8 ⁺ -Epitope in Peptid 3			
		DQB1*03:02	DQB1*05:01	ILYQTPDFL		A*02:01	
		DRB1*01:01	DRB1*04:04	ILYQTPDFLV		A*02:01	
	DRB4*01:03	YQTPDFLVY		C*02:02			

Abkürzungen: c-ALL – *common acute lymphoblastic leukemia*; häufige Form der akuten lymphatischen Leukämie, MLL⁺ – *mixed lineage leukemia gene rearrangement (KMT2A)*; Umlagerung des MLL-Gens (KMT2A), pre-B-ALL – *pre-B cell acute lymphoblastic leukemia*; prä-B-Zell akute lymphatische Leukämie, pro-B-ALL – *pro-B cell acute lymphoblastic leukemia*; pro-B-Zell akute lymphatische Leukämie, BAL – *biphenotypic acute leukemia*; biphänotypische akute Leukämie, T-ALL – *T cell acute lymphoblastic leukemia*; T-Zell akute lymphatische Leukämie.

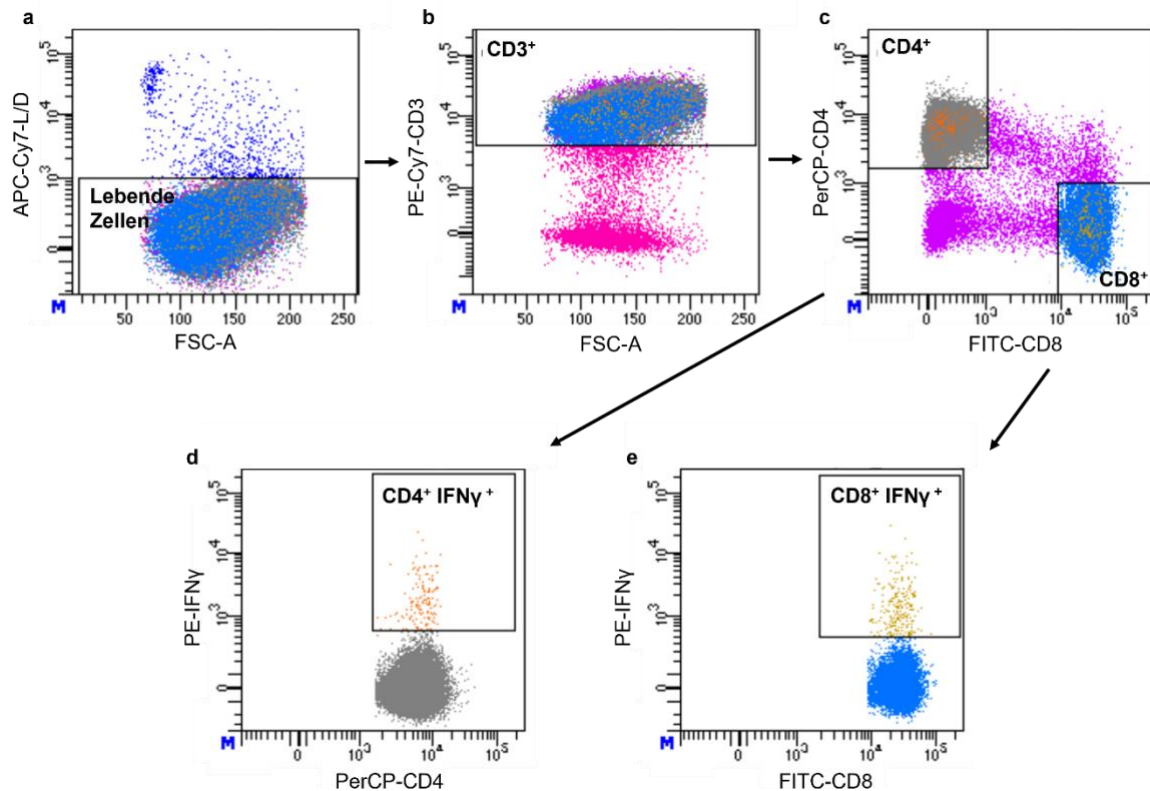


Abbildung 6 Exemplarische Gating-Strategie zur Einzelzellsortierung impfstoffreaktiver T-Zellen für die TCR-Sequenzierung.

Dargestellt ist die Sortierung IFN γ -positiver CD4 $^+$ - und CD8 $^+$ -T-Zellen nach Stimulation mit Peptid 3 bei Patient ALL0112.

a) Vorauswahl lebender Zellen mittels Viabilitätsfärbung; (b) Selektion CD3 $^+$ -T-Zellen; (c) Unterteilung in CD4 $^+$ - und CD8 $^+$ -T-Zellen; (d) Detektion IFN γ -positiver Zellen innerhalb der CD4 $^+$ -Population; (e) Detektion IFN γ -positiver Zellen innerhalb der CD8 $^+$ -Population.

Die hier dargestellte Selektion IFN γ $^+$ -Zellen erfolgte exemplarisch; alternativ wurden in anderen Experimenten CD154 $^+$ -Zellen sortiert, abhängig von der vorausgegangenen Reaktivitätsanalyse im Immunmonitoring. Die gezeigten Gating-Schritte stellen eine vereinfachte Darstellung dar; initiale Gates (z. B. für Lymphozyten, Singlets) wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Die als funktionell reaktiv identifizierten Zellen wurden jeweils als Einzelzellen in vorbereitete 96-Well-PCR-Platten sortiert und für die nachfolgende Einzelzellsequenzierung der TCRs verwendet.

Nach Abschluss der Sortierung wurden die Platten mit Axygen Plate Sealers versiegelt, auf Trockeneis eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Proben wurden zur Einzelzell-TCR-Sequenzierung an den Kooperationspartner Leo Hansmann übermittelt.

2.4.6 Kriterien und Auswahl der Impfpeptide

Im Rahmen der IVAC-RCC-Studie wurde für einen Patienten ein individueller Impfstoff aus mutierten Peptiden zusammengestellt. Die Grundlage für die Peptid-Auswahl bildeten Exom- und Transkriptomsequenzierungen von Tumor- und Normalgewebe, die durch die Abteilung Humangenetik durchgeführt und anschließend vom Quantitative Biology Center (QBIC) bioinformatisch analysiert wurden. Auf Basis dieser Daten wurden potenzielle Neoepitope identifiziert, die als Kandidaten für die Impfstoffformulierung in Frage kamen.

Die HLA-Typisierung des Patienten erfolgte mithilfe des OptiType-Algorithmus. Über eine Sliding-Window-Analyse wurden zunächst Peptide mit einer Länge von 8 bis 12 Aminosäuren für MHC-Klasse-I generiert. Die entsprechenden MHC-Klasse-II-Kandidaten wurden durch Verlängerung dieser Sequenzen auf 15 Aminosäuren erstellt.

Die Auswahl der finalen Impfpeptide basierte auf definierten Priorisierungskriterien. Zur Bewertung der HLA-Bindungsaffinität wurden die Algorithmen netMHC, netMHCpan und SYFPEITHI eingesetzt; als Binder galten dabei nur solche Peptide, die in allen drei Programmen eine hohe Affinität aufwiesen. Zusätzlich wurden die Mutationshäufigkeit sowie die Transkriptionsrate der mutierten Allele berücksichtigt. Peptide mit nachgewiesener Expression im Tumortranskriptom und hoher Transkriptionsrate wurden bevorzugt, während Varianten mit geringer oder fehlender Expression ausgeschlossen wurden. Auch die technische Machbarkeit der Peptidesynthese wurde einbezogen: Sequenzen mit ungünstigen physikochemischen Eigenschaften – etwa Cystein, Histidin oder Prolin am C-Terminus – wurden ausgeschlossen oder durch nächsthöher priorisierte Kandidaten ersetzt.

Die final ausgewählten Peptide wurden entsprechend der priorisierten Rangliste zur Herstellung beauftragt und unter GMP-Bedingungen im Wirkstoffpeptidlabor in Tübingen synthetisiert. Dort erfolgten auch die Qualitätskontrolle der synthetisierten Peptide sowie die Formulierung des Impfstoffs in Kombination mit geeigneten Adjuvantien. Die identischen Peptide kamen zudem im *ex vivo* Immunomonitoring zum Einsatz, bei dem sie zur Antigen-spezifischen Aktivierung von PBMCs verwendet wurden (vgl. Kapitel 2.4.1).

2.4.7 CRISPR-Cas9-vermittelter orthotoper TCR-Austausch: Etablierung und Anwendung

Die OTR-Methode ermöglicht die gezielte genetische Modifikation von T-Zellen durch den Ersatz des endogenen TCR mit einem spezifischen, transgenen TCR. Diese Strategie basiert auf einer CRISPR-Cas9-vermittelten homologiegesteuerten Rekombination (HDR) und erlaubt die präzise Integration der gewünschten TCR-Sequenz in das Genom der Zielzellen.

Ein zentraler Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Expression des endogenen TCR ausgeschaltet und durch eine monoallele, definierte Expression des transgenen TCR ersetzt wird. Dadurch lässt sich eine physiologischere TCR-Expression und verbesserte Funktionalität erzielen – insbesondere im Vergleich zu konventionellen retroviralen oder lentiviralen Transduktionssystemen. Dies macht OTR zu einer attraktiven Option für den Einsatz in präklinischen Modellen und perspektivisch auch in adoptiven T-Zelltherapien.

Die OTR-Technik wurde durch unsere Kooperationspartner am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München (AG Dirk Busch) etabliert und freundlicherweise demonstriert. Aufbauend auf dem in München gezeigten Protokoll wurde die Methode im Tübinger Labor angepasst und etabliert, um sie für die vorliegenden Experimente anzuwenden und perspektivisch für weitere Projekte nutzbar zu machen. Als Modellzelllinie dienten Jurkat-Zellen mit Reporterkonstrukten für die Signalwege NF- κ B, NFAT und AP-1.

Die methodische Adaption umfasste insbesondere die Anpassung an vorhandene Laborausstattung und etablierte Arbeitsabläufe in Tübingen: So wurde das Neon NxT Electroporation System verwendet, was eine individuelle Optimierung der Elektroporationsparameter erforderlich machte. Zudem wurden die Protokolle für die Generierung der sgRNA, das Design der DNA-Templates sowie die Sortier- und Anreicherungsverfahren der transfizierten Zellen überarbeitet und für die lokalen Bedingungen angepasst.

Im Folgenden werden die methodischen Schritte zur Anwendung der OTR-Technik in Tübingen beschrieben.

2.4.7.1 Implementierung und Etablierung der OTR-Methode in Tübingen

Zur Herstellung experimenteller Modellzellen mit definierten TCRs wurde die CRISPR-Cas9-basierte OTR-Technik für den Einsatz in Tübingen angepasst und etabliert. Aufbauend auf dem Münchner Protokoll wurden insbesondere das Template-Design, die Elektroporationsbedingungen sowie die Selektion der

modifizierten Zellen auf die hiesige Laborinfrastruktur abgestimmt, um eine robuste und reproduzierbare Durchführung zu gewährleisten.

Zur Etablierung der Methode wurden T-Zell-Rezeptorsequenzen aus Patientenproben klinischer Studien und individueller Heilversuche verwendet, die eine Peptidvaksinierung erhalten hatten. Hierzu gehörten TCRs aus der Phase-I/II-Studie IVAC-ALL-1, in der pädiatrische Patientinnen und Patienten mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie (B-Vorläufer-ALL) personalisierte Peptidimpfungen erhielten. Im Rahmen der dazugehörigen IVAC-ALL-1-Analyse (IVAC-AN) wurden zuvor kryokonservierte PBMCs dieser Patientinnen und Patienten aufgetaut und mit den entsprechenden Impfpeptiden stimuliert. Aktivierte T-Zellen wurden nach *in vitro* Kultur und Restimulation mittels FACS anhand der Expression von CD154 oder IFN γ indexsortiert. Die nachfolgende Einzelzellsequenzierung ermöglichte die Identifikation von TCRs, die im Verlauf der Impfung expandiert waren. Die experimentelle Strategie zur TCR-Identifikation ist schematisch in Abbildung 7 Schematischer Überblick zur Identifikation impfstoffinduzierter T-Zell-Rezeptoren im Rahmen der IVAC-ALL-1-Analyse.

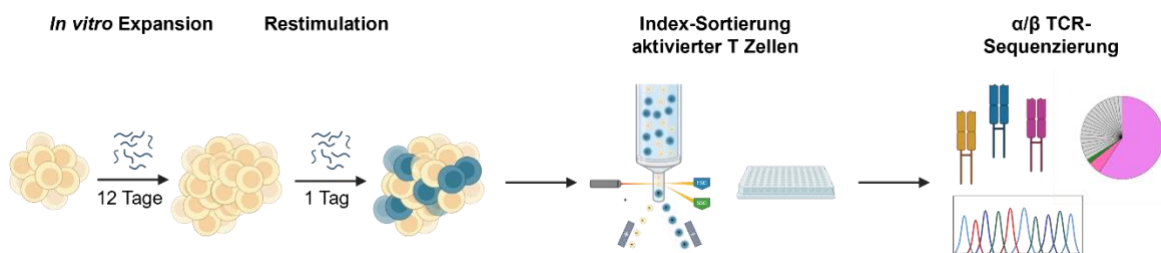


Abbildung 7 Schematischer Überblick zur Identifikation impfstoffinduzierter T-Zell-Rezeptoren im Rahmen der IVAC-ALL-1-Analyse.

Kryokonservierte PBMCs wurden zunächst mit patientenspezifischen Impfpeptiden stimuliert und über 12 Tage *in vitro* expandiert. Nach einer eintägigen Restimulation mit demselben Peptid erfolgte die Indexsortierung aktivierter T-Zellen anhand der Expression von CD154 oder IFN γ . Die so isolierten Zellen wurden einer Einzelzellsequenzierung unterzogen, um klonale tumorspezifische $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren zu identifizieren.

Kryokonservierte PBMCs wurden zunächst mit patientenspezifischen Impfpeptiden stimuliert und über 12 Tage *in vitro* expandiert. Nach einer eintägigen Restimulation mit demselben Peptid erfolgte die Indexsortierung aktivierter T-Zellen anhand der Expression von CD154 oder IFN γ . Die so isolierten Zellen wurden einer Einzelzellsequenzierung unterzogen, um klonale tumorspezifische $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren zu identifizieren. dargestellt. Zwei der detektierten Rezeptorsequenzen wurden für die orthotope TCR-Integration ausgewählt und in Jurkat-Zellen eingebracht.

Ein vergleichbares Vorgehen wurde für eine Patientin mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) angewandt, die ebenfalls eine individualisierte Peptidvakzinierung erhalten hatte. Als Kontrolle diente ein in der Literatur beschriebener Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischer TCR. Die genauen Details zu den verwendeten TCR-Konstrukten sind in Kapitel 2.4.7.2 näher beschrieben.

Durch die Implementierung der OTR-Technik in Tübingen können potenziell antigenspezifische T-Zellen für experimentelle Analysen generiert werden, wodurch die Abhängigkeit von limitiertem Patientenmaterial für Forschungszwecke verringert werden könnte. Dies könnte insbesondere für weiterführende funktionelle Untersuchungen von Vorteil sein. Nach erfolgreicher Optimierung und Implementierung wurde die OTR-Technik für nachfolgende Experimente genutzt.

Die technischen Details zur Template-Konstruktion, Elektroporation und Selektion der modifizierten Zellen sind in den Kapiteln 2.4.7.2 bis 2.4.7.5 beschrieben

2.4.7.2 DNA-Template Design

Für die Etablierung der CRISPR-Cas9-vermittelten OTRs wurde ein TCR-Konstrukt entworfen, das eine gezielte Integration transgener TCR- α - und - β -Ketten in die TRAC- beziehungsweise TRBC-Loci der Zielzellen ermöglicht. Das Design basiert auf einer modularen Struktur mit spezifischen Homologiearmen, die eine Integration über homologiegesteuerte Rekombination (HDR) fördern und zugleich den *Knock-out* des endogenen TCRs sicherstellen.

Zur Gewährleistung der Antigenpezifität wurden die variablen Domänen der α - und β -Ketten mit den jeweils passenden V(D)J-Segmenten versehen. Die CDR3-Regionen wurden zuvor mittels Einzelzellsequenzierung identifiziert und in das Template integriert, um eine physiologisch relevante und funktionelle TCR-Expression zu ermöglichen.

In der folgenden Tabelle sind die CDR3-Sequenzen aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Konstruktion transgener TCRs im Rahmen der OTR-Experimente verwendet wurden:

Tabelle 6 Verwendete CDR3-Sequenzen für die Konstruktion transgener TCRs im Rahmen der OTR-Experimente.

Dargestellt sind die jeweils identifizierten CDR3-Regionen der α - und β -Kette, die für die Integration in Jurkat-Zellen verwendet wurden. Die TCRs stammen aus der IVAC-ALL-1-Studie, einem individuellen Heilversuch sowie einem EBV-spezifischen Referenz-TCR.

Herkunft	CDR3- β -Sequenz	CDR3- α -Sequenz
ALL 0107 (CD4 ⁺ , P3)	CASSSGHRGGNEQFF	CLVASGGGTSYGKLTf
ALL 0107 (CD8 ⁺ , P3)	CASSQDLGTGGPNEQFF	CAMREGPRNQGGKLIF
Heilversuch AR (P3-6)	CASSRTGNSNQPHF	CIVRGTRTGTASKLTf
Heilversuch AR (P4-4/P5-7)	CASSQLTGGINYGTYF	CAMSVSSNDYKLSF
EBV-spezifischer TCR	CSARDGTGNGTYF	CAEDNNARLMF

Eine vollständige Darstellung des modularen TCR-Konstrukts, das für die Klonierung der transgenen Rezeptoren verwendet wurde, findet sich im Anhang 6.2.1. Die jeweils detektierten CDR3-Sequenzen der α - und β -Kette (vgl. Tabelle 6) wurden spezifisch in dieses Template integriert.

Die α - und β -Ketten wurden durch selbstspaltende P2A- und T2A-Peptide verbunden, sodass ihre polyzistronische Expression aus einem einzelnen Transkript gewährleistet ist. Zur Stabilisierung der mRNA wurde zusätzlich ein bovines Polyadenylierungssignal (bGHpA) eingebaut.

Um erfolgreich editierte Zellen zuverlässig identifizieren zu können, wurde die β -Kette mit einer murinen TCR- β -Konstantregion (mTRBC-Cys) versehen, deren Einbau ausschließlich der Detektion dient und die keine funktionelle Beeinträchtigung der TCR-vermittelten Signalübertragung bewirkt. Dadurch kann über Durchflusszytometrie zwischen korrekt editierten, partiell editierten und nicht editierten Zellen differenziert werden.

Durch die Integration des transgenen Konstrukts in den TRAC-Lokus wird gleichzeitig die endogene α -Kette ausgeschaltet, da das erste Exon durch die HDR-vermittelte Rekombination unterbrochen wird. Parallel dazu erfolgte eine gezielte Inaktivierung des TRBC-Lokus mittels CRISPR-Cas9, um die Expression der endogenen β -Kette zu verhindern. Die murine TRBC-Konstante im Template dient der spezifischen Detektion der transgenen β -Kette und ermöglicht eine eindeutige Identifikation korrekt editierter Zellen. Dieses duale Design verhindert die Koexpression endogener Ketten und minimiert das Risiko fehlerhafter TCR-Paarung.

Die Templates wurden synthetisch erzeugt und in den pTwist-AMP-Plasmidvektor kloniert, um eine effiziente Bereitstellung für die nachfolgende elektroporative Integration zu ermöglichen. Eine schematische Darstellung des modularen Template-Designs findet sich in im Anhang dieser Arbeit.

2.4.7.3 Amplifikation und Aufreinigung der HDR-Templates mittels PCR

Zur Gewinnung linearer, doppelsträngiger Templates für die CRISPR-Cas9-vermittelte Integration wurden die zuvor in den Vektor pTwist-AMP klonierten TCR-Konstrukte mittels PCR direkt aus Plasmid-DNA amplifiziert. Die Amplifikation diente der Herstellung von HDR-Templates mit definierten Homologiearmen und transgenen TCR-Sequenzen zur anschließenden Elektroporation.

Die PCR wurde unter Verwendung der *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies) durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurde ein 100 μL umfassender Mastermix auf Eis angesetzt, bestehend aus 65 μL PCR-grade Wasser, 20 μL 5 \times Herculase II Reaction Buffer, je 4 μL eines spezifischen Forward- und Reverse-Primers (Endkonzentration jeweils 0,4 μM), 5 μL eines dNTP-Mix (Endkonzentration 0,5 mM), 1 μL Herculase II Polymerase sowie 1 μL Plasmid-DNA in einer Endkonzentration von 60 ng. Die fertigen Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und im *Thermocycler* amplifiziert.

Die PCR erfolgte mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 34 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, Primeranlagerung (*Annealing*) bei 62 °C für 30 Sekunden und Extension bei 72 °C für 3 Minuten. Eine finale Elongation bei 72 °C für weitere 3 Minuten schloss den Zyklus ab, bevor die Proben bei 4 °C gehalten wurden.

Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte einer Gelelektrophorese unterzogen, weiterverarbeitet und aufgereinigt. Die Qualität und Konzentration des aufgereinigten HDR-Templates wurden im Anschluss überprüft. Für die nachfolgende Elektroporation wurden ausschließlich Amplifikate mit klar definierter Einzelbande und ausreichender DNA-Konzentration verwendet.

2.4.7.4 Durchführung der Elektroporation

Die stabile Integration der TCR-Konstrukte in das Genom von Jurkat-Zellen erfolgte durch eine CRISPR-Cas9-vermittelte homologiegesteuerte Rekombination (HDR). Zur Etablierung dieser Methode wurde die J-TPR-Zelllinie verwendet, die freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern in München zur Verfügung

gestellt wurde. Die Elektroporation wurde unter Verwendung des Neon NxT Electroporation Systems durchgeführt.

Vorbereitung der CRISPR-Cas9 RNP-Komplexe

Am Tag der Elektroporation wurden die Jurkart-Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/mL eingestellt.

Für jeden Elektroporationsansatz wurden 100 μ L dieser Zellschlösung in ein *Well* einer 96-*Well*-Platte pipettiert, zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in 110 μ L R-Puffer (Thermo Fisher Scientific) resuspendiert. Die Gesamtzusammensetzung des R-Puffers umfasste $2 \times 6 \mu$ L zuvor assemblierten RNP-Komplexe sowie eine definierte Menge an DNA-Template.

Zur gezielten Ausschaltung der endogenen TCR- α - und TCR- β -Ketten wurden zwei spezifische sgRNAs eingesetzt (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). Die Bildung der gRNAs erfolgte durch Mischen äquimolarer Mengen von crRNA (80 μ M) und tracrRNA (80 μ M) für jeweils hTRAC und hTRBC. Anschließend wurde das Cas9-Protein auf eine Endkonzentration von 6 μ M eingestellt und vorsichtig ohne Schaumbildung mit PBS vermischt.

Zur Steigerung der Editierungseffizienz wurden die gRNAs mit 1,8 μ M Elektroporations-Enhancer versetzt. Anschließend wurde das Cas9-Protein langsam und gleichmäßig unter Vermeidung von Präzipitatbildung hinzugefügt. Die fertigen RNP-Komplexe wurden unmittelbar vor der Elektroporation frisch hergestellt oder alternativ bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Elektroporation mit dem Neon NxT System

Vor Beginn der Elektroporation wurde das Neon NxT System mit der entsprechenden Röhrenkammer ausgestattet und mit 2 mL Elektrolytpuffer E100 befüllt. Das vorbereitete Payload-Gemisch – bestehend aus 1–2 μ g DNA-Template sowie je 6 μ L der beiden RNP-Lösungen – wurde den resuspendierten Zellen zugesetzt.

Zur Aufnahme des Payloads wurde eine sterile Goldspitze auf die Neon NxT Pipette aufgesteckt. Das Zellgemisch wurde vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und anschließend ohne Lufteinschlüsse langsam in die Pipettenspitze aufgezogen. Die Spitze wurde in die Röhrenkammer eingeführt, bis sie hörbar einrastete. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Parametern: 1.700 V, 20 ms Pulsdauer, 1 Puls, Verwendung des R-Puffers. Nach Aktivierung des „Electroporate“-Befehls wurde der elektrische Impuls ausgelöst.

Nachkultivierung und Selektion

Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in ein *Well* einer 24-*Well*-Platte überführt, das mit vorgewärmtem STM-Medium vorgelegt worden war. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C ohne Antibiotikum. Am Folgetag wurde das Medium durch vollständiges Medium mit Antibiotikum ersetzt. Nach einer dreitägigen Kulturphase konnte der Erfolg der Genomeditierung (*Knock-in* und *Knock-out*) durch Durchflusszytometrie überprüft werden.

2.4.7.5 Sortierung mTRBC-positiver Zellen mit dem Tyto® Cell Sorter

Die Anreicherung erfolgreich editierter Zellen erfolgte durch mikrofluidische Hochgeschwindigkeitszellsortierung mithilfe des MACSQuant® Tyto® Cell Sorters (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Dieses geschlossene, sterile System minimiert mechanische Belastungen, verhindert Aerosolbildung und potenzielle Kontaminationen und trägt so zur Erhaltung einer hohen Zellviabilität und Funktionalität bei.

Zellpräparation und Färbestrategie

Nach Abschluss der Kultivierungsphase wurden die mittels OTR modifizierten Jurkat-Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gegen die murine TCR- β -Konstante (mTRBC) sowie gegen die humane TCR- α -Kette (hTRAC) gefärbt. Diese gezielte Markierung ermöglichte eine eindeutige Identifikation der korrekt editierten Zielzellen: Für die Sortierung berücksichtigt wurden ausschließlich solche Zellen, die mTRBC exprimierten, jedoch kein Signal für hTRAC aufwiesen. Da das transgene Konstrukt in den TRAC-Lokus integriert wurde, geht mit der erfolgreichen Integration zugleich die Ausschaltung der endogenen α -Kette einher – ein fehlendes hTRAC-Signal ist somit ein funktioneller Indikator für korrekte OTR-Editierung. Die murine TRBC-Konstante wurde in das Konstrukt eingefügt, um die transgene β -Kette spezifisch nachweisen zu können. Die endogene TRBC-Expression wurde parallel durch gezielte CRISPR-Cas9-vermittelte Inaktivierung ausgeschaltet, sodass die mTRBC-Positivität auch für die β -Kette eine eindeutige Markerfunktion übernimmt. Zellen mit gleichzeitigem Nachweis beider Marker – ein Hinweis auf unvollständige oder fehlerhafte Integration – sowie Populationen mit isolierter Expression von hTRAC bei fehlender mTRBC-Expression wurden gezielt ausgeschlossen.

Die gefärbten Zellen wurden anschließend in MACSQuant® Tyto® Running Buffer resuspendiert und auf eine maximale Konzentration von 2×10^7 Zellen/mL eingestellt. Um Zellaggregate zu entfernen und einen gleichmäßigen Fluss

innerhalb des mikrofluidischen Systems zu gewährleisten, erfolgte eine Filtration durch einen 20- μ m-Pre-Separation-Filter unmittelbar vor der Sortierung.

Sortierung mit dem MACSQuant Tyto Cell Sorter

Für die Sortierung wurde eine sterile MACSQuant® Tyto® Cartridge HS verwendet. Diese verfügt über drei voneinander getrennte Kammern: eine Inputkammer, eine positive Sammlungskammer für die Zielpopulation sowie eine negative Sammlungskammer für die nicht angereicherten Zellen. Vor der Applikation der Zellen wurde die Kartusche gemäß Herstellerangaben mit 300 μ L Running Buffer befüllt, um eine gleichmäßige Benetzung aller Kanäle sicherzustellen. Zusätzlich wurde sie vorsichtig über den Luer-Lock-Eingang mit einer Spritze durchspült, um verbliebene Luftblasen vollständig zu entfernen.

Die Zellprobe wurde im Anschluss behutsam und blasenfrei in die Inputkammer der Kartusche überführt. Während des Sortierprozesses sorgte ein Magnetrotor im Inneren des Sorters für eine kontinuierliche Suspension und gleichmäßige Durchmischung der Zellen. Der Zellfluss durch die mikrofluidischen Kanäle erfolgte unter moderatem Luftdruck, wobei ein interner Filter innerhalb der Kartusche größere Aggregate zuverlässig zurückhielt.

Innerhalb des integrierten Mikrochips wurden die Zellen durch drei Laserstrahlen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert. Bei detektierter mTRBC-positiver und gleichzeitig hTRAC-negativer Signatur wurde ein magnetisch gesteuertes Mikroventil aktiviert, das die jeweilige Zielzelle präzise in die positive Sammlungskammer leitete. Zellen mit fehlerhafter Integration oder ohne TCR-*Knock-out* wurden in die negative Fraktion ausgeleitet.

Zur Sicherstellung einer maximalen Reinheit erfolgte die Sortierung in zwei Schritten: Zunächst wurde eine Bulksortierung zur groben Anreicherung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in einem zweiten, hochpräzisen Sortiervorgang erneut überführt. Hierfür wurde eine weitere, frische MACSQuant® Tyto® Cartridge verwendet, die vorab ebenfalls vollständig geprimt worden war.

Nachbereitung und funktionelle Validierung

Nach Abschluss der Sortierung wurden die angereicherten mTRBC-positiven, hTRAC-negativen Zellen aus der positiven Sammlungskammer entnommen und in vollständigem RPMI-1640-Medium überführt und weiterkultiviert. Anschließend erfolgte die Validierung der erfolgreichen Integration des transgenen TCRs durch Durchflusszytometrie: Die Zielzellen zeichneten sich durch das Fehlen von hTRAC (*Knock-out*) sowie die Expression der murinen mTRBC-Konstante (*Knock-in*) aus.

Die funktionelle Aktivierbarkeit der eingebrachten TCR-Konstrukte wurde nach Antigenstimulation über die Induktion von Reporter-Signalen für NF- κ B (eCFP) und NFAT (eGFP) überprüft.

In Tübingen wurde die OTR-Methode auf Basis der Sequenzen aus der IVAC-AN-Studie etabliert und optimiert. Während in Tübingen vor allem die Etablierung der Methode und die Validierung der Technik im Fokus standen, wurden im Rahmen der Kooperation mit den Kooperationspartnern in München hauptsächlich transgene T-Zellen mit dieser Methode hergestellt und funktionell getestet. In München wurden die transgenen T-Zellen mit HLA-kompatiblen APCs kultiviert, die mit dem jeweiligen Peptid beladen waren. Hierbei handelte es sich um CD40-stimulierte B-Zell-Blasten, die durch Ko-Kultivierung mit CD40L⁺ Stimulatorzellen generiert wurden. Die Funktionalität der T-Zellen wurde durch die Aktivierung der Reporter-Signale (NF- κ B und NFAT) bestätigt.

2.4.8 Tetramerbasierte Validierung der Peptidbindung transgener TCRs

Zur Validierung der Peptidbindung durch transgene TCRs wurde eine Tetramerfärbung unter Verwendung des Flex-T™-Systems (BioLegend) durchgeführt. Dabei kamen UV-reaktive Flex-T™-Monomere mit einer HLA-A*02:01-Bindungsdomäne zum Einsatz, die über eine photolabile Peptidbindung verfügten und durch UV-Bestrahlung mit dem spezifischen Impfpeptid beladen wurden. Die so hergestellten Monomere wurden anschließend mit fluorochrom-konjugiertem Streptavidin (BV421 beziehungsweise APC) tetramersiert.

Für die Peptidladung wurden 3 μ l einer 400 μ M Peptidlösung mit 3 μ l UVX-Monomer (200 μ g/ml) in einer 96-Well-V-Boden-Platte vermischt, zentrifugiert (2.500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 2 min) und anschließend 30 min bei 365 nm (Abstand: 2–5 cm) auf Eis bestrahlt. Die anschließende Inkubation erfolgte 30 min bei 37 $^{\circ}$ C im Dunkeln. Zur Tetramerisierung wurden 30 μ l des beladenen Monomers mit 0,55 μ l APC-konjugiertem Streptavidin beziehungsweise mit 0,22 μ l BV421-konjugiertem Streptavidin versetzt und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,38 μ l Blockierlösung (bestehend aus 1,6 μ l 50 mM D-Biotin und 6 μ l 10 % NaN₃ in 192,4 μ l PBS) gestoppt. Die fertigen Tetramere wurden entweder über Nacht bei 2–8 $^{\circ}$ C gelagert oder direkt für die Färbung verwendet.

Für die Färbung wurden 2×10^6 mittels OTR modifizierte Jurkat-TPR-Zellen mit 2 μ l Tetramermischung in einem Endvolumen von 200 μ l FACS-Puffer inkubiert (30 min, Eis, Dunkelheit). Es kamen je ein Tetramer mit BV421- und APC-Konjugat zum Einsatz. Die gleichzeitige Färbung mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Tetrameren erhöht die Spezifität der Detektion, da nur doppelt-positive Signale als eindeutig peptidspezifisch gewertet werden. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer BD LSRFortessa™ analysiert. Die Auswertung erfolgte im *Dot-Plot* (BV421 vs. APC) anhand einer Quadrantenanalyse. Die *Gating*-Strategie bezog sich auf lebende Einzelzellen (*Singlets*). Eine Kompensation der Spektren war aufgrund fehlender Single-Positive-Kontrollen nicht möglich, da die Tetramere an konstitutiv exprimierte TCRs binden. Zur Kontrolle der Spezifität wurden drei Vergleichsbedingungen eingeführt: (i) Zellen ohne Zugabe eines Tetramers zur Erfassung der intrinsischen Hintergrundfluoreszenz, (ii) Färbung mit einem Tetramer, das mit einem nicht relevanten Kontrollpeptid beladen war, sowie (iii) die Positivbedingung mit einem Tetramer, das mit dem entsprechenden Impfpeptid beladen wurde. Diese Kontrollen ermöglichten eine differenzierte Bewertung der Spezifität der Tetramerbindung an transgene TCRs.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse zur Isolierung, Charakterisierung und funktionellen Validierung antigenspezifischer T-Zellen aus der IVAC-AN-Studie vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt auf der Einzelzellsortierung CD154⁺- und IFN γ ⁺-reaktiver T-Zellen, der Analyse ihrer klonalen Zusammensetzung sowie der funktionellen Testung ausgewählter TCR-Kandidaten. Ein besonderer Fokus gilt der Identifizierung KRAS^{G12V}-spezifischer TCRs und deren funktionelle Aktivität im Kontext solider Tumorerkrankungen. Die erhobenen Daten liefern grundlegende Erkenntnisse zur Qualität der durch die Vakzinierung induzierten Immunantworten und eröffnen Perspektiven für die therapeutische Anwendbarkeit impfstoffreaktiver T-Zellen.

3.1 Einzelsortierung und Charakterisierung impfreaktiver T-Zellen

3.1.1 Strategie zur Einzelsortierung antigenreaktiver T-Zellen

Die Sortierung antigenreaktiver T-Zellen basierte auf den Ergebnissen des Immunomonitorings der IVAC-ALL-1-Studie, in der patientenspezifische Immunantworten auf verschiedene Peptide untersucht worden waren. Diese Daten bildeten die Grundlage für die IVAC-AN-Analyse, insbesondere zur Auswahl geeigneter Zeitpunkte für die Einzelsortierung sowie zur Definition der *Gating*-Strategien.

Für die Auswahl der Impfpeptide wurden ausschließlich solche berücksichtigt, für die im Immunomonitoring eine spezifische Antwort detektiert werden konnte. Dabei handelte es sich sowohl um MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-präsentierte Peptide, sodass in der Folge sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen isoliert wurden. Die ausgewählten Peptide basierten auf patientenspezifischen Tumormutationen und wurden individuell anhand der genomischen Charakterisierung zusammengestellt.

Hierfür wurden PBMCs aus zuvor kryokonservierten Patientenproben aufgetaut und *in vitro* mit den jeweils relevanten Peptiden stimuliert. Abhängig vom Immunantwortmuster – entweder charakterisiert durch CD154-Expression als Marker kürzlich aktivierter T-Zellen oder durch die Produktion von IFN γ als Effektorfunktion – erfolgte die spezifische Färbung der Zellen und deren Vorbereitung zur anschließenden Sortierung.

Die Einzelsortierung wurde mittels FACS durchgeführt. Definierte Zellpopulationen wurden anhand charakteristischer Oberflächenmarker isoliert, um antigenspezifische T-Zellen für weiterführende molekulare und funktionelle Analysen zu gewinnen. Die im Immunomonitoring beobachteten Reaktivitäten bestimmten dabei, welche T-Zell-Subpopulation (CD4⁺ oder CD8⁺) zum Sortierzeitpunkt im Fokus stand. Eine Übersicht der analysierten Patientinnen und Patienten mit Angaben zu Diagnose, HLA-Typisierung, ausgewählten Impfpeptiden und beobachteten Immunantworten ist in Tabelle 5 Übersicht der Patientinnen und Patienten der IVAC-ALL-1-Studie.

Für jede Patientin beziehungsweise jeden Patienten sind die Diagnose, die vollständige HLA-Typisierung sowie die im individuellen Impfstoff enthaltenen Peptide (Aminosäuresequenz / Gen / Mutation), deren vorhergesagte HLA-Restriktion und das Ergebnis der funktionellen Immunantwort im Immunomonitoring

dargestellt. Eine Immunantwort wurde anhand des Stimulation Index (SI) nach ex vivo-Restimulation definiert. Potenzielle CD8⁺-Epitope innerhalb längerer, ursprünglich MHC-Klasse-II-prädizierter Peptide wurden zusätzlich aufgeführt, sofern sie bioinformatisch vorhergesagt wurden dargestellt.

3.1.2 Phenotypische Charakterisierung der sortierten T-Zellen

Auf Grundlage der IVAC-AN-Daten wurden T-Zellen gezielt nach der Expression der Aktivierungsmarker CD154 oder der funktionellen Marker IFN γ sowie nach ihrer Zuordnung zu CD4⁺- oder CD8⁺-Subpopulationen sortiert, um beide T-Zelltypen differenziert analysieren zu können. Abhängig vom Probenmaterial konnten dabei vier distinkte Zielpopulationen unterschieden: CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen mit positiver Expression von CD154 oder IFN γ .

Die *Gating*-Strategie zur Isolierung dieser Zielpopulationen folgte einem mehrstufigen Ansatz: Nach Ausschluss zellulärer Trümmer im FSC/SSC-Gate wurden intakte Singlets identifiziert, um Doppelereignisse zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Selektion lebender Zellen mittels Viabilitätsfärbung, gefolgt von der Abgrenzung auf CD4⁺- beziehungsweise CD8⁺-T-Zellen. Innerhalb dieser Subsets wurden schließlich die CD154⁺- oder IFN γ ⁺-Zellen gezielt selektiert und sortiert.

Zur Validierung der *Gating*-Strategie und zur Sicherstellung einer hohen Spezifität und Reinheit der sortierten Populationen wurden sowohl *Fluorescence-Minus-One-(FMO)*-Kontrollen als auch DMSO-behandelte Zellen als Negativbedingung herangezogen. FMO-Kontrollen umfassen alle verwendeten Fluorochrome mit Ausnahme desjenigen, das für den zu prüfenden Marker verwendet wird. Dadurch lassen sich Hintergrundfluoreszenz und Überlappungen zwischen Kanälen exakt bestimmen und ein präzises *Gating* ermöglichen. Diese Maßnahmen ermöglichten eine verlässliche Abgrenzung unspezifischer Signale und trugen zur präzisen Identifikation antigen-spezifischer Zellen bei.

3.1.3 Klonalität und Diversität der T-Zellpopulationen

Die zuvor selektierten CD154⁺- und IFN γ ⁺-T-Zellen wurden anschließend einer TCR-Einzelzellsequenzierung unterzogen. Die vollständige *Gating*-Strategie ist im Methodenteil beschrieben. Für jede isolierte Population wurden die

CDR3-Regionen der TCR α - und TCR β -Ketten bestimmt, da diese maßgeblich an der Erkennung des jeweiligen Peptid-MHC-Komplexes beteiligt sind.

Bei einzelnen Patientinnen und Patienten wurden für ein identisches Peptid sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellantworten detektiert. Dies betraf insbesondere längere, ursprünglich als MHC-Klasse-II-restringiert vorhergesagte Peptide, bei denen zusätzlich potenzielle CD8⁺-Epitope bioinformatisch identifiziert worden waren. In diesen Fällen zeigte sich teilweise eine unterschiedliche klonale Zusammensetzung in den jeweiligen Subpopulationen, mit tendenziell polyklonalerer Verteilung in der CD4⁺-Fraktion.

Die klonale Diversität der analysierten Populationen wurde durch kombinierte Darstellung in Kuchendiagrammen und tabellarischen Übersichten veranschaulicht (Abbildung 8 Klonverteilung der CD4⁺- T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit dem Peptid ZCCHC3 D269fs.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit einem Peptid aus dem ZCCHC3-Protein (Zinc finger CCHC-type containing 3) mit einer frameshift-Mutation an Position D269. Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in Tabelle 7 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit ZCCHC3 D269fsaufgeführt.- Abbildung 17 Klonverteilung der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit den Peptiden ABI1 G15R, MLXIP C521Y und PLA2G6 N601Y.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der T-Zellen nach Stimulation mit Peptiden aus den Proteinen ABI1 (Abl interactor 1, G15R-Mutation), MLXIP (MLX interacting protein, C521Y-Mutation) und PLA2G6 (Phospholipase A2 group VI, N601Y-Mutation). Von links nach rechts: CD8⁺-T-Zellen mit ABI1 G15R (Zeitpunkt V10), CD8⁺-T-Zellen mit ABI1 G15R (V11), CD8⁺-T-Zellen mit MLXIP C521Y (V12) sowie CD4⁺-T-Zellen mit PLA2G6 N601Y (V17). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 29 - Tabelle 32 aufgeführt. In den Kuchendiagrammen sind die fünf häufigsten TCR-Klone farblich hervorgehoben, während die übrigen Klone als zusammengefasste Gruppe in grauer Farbe dargestellt werden. Die zugehörigen Tabellen enthalten detaillierte Informationen zu den CDR3-Sequenzen der TCR α - und TCR β -Ketten, zur Klonfrequenz sowie zur relativen Größe der jeweiligen Klone, also ihrem prozentualen Anteil innerhalb der untersuchten Population.

Zwischen der Anzahl verabreichter Impfpeptide und der klonalen Diversität ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang feststellen. Zwar erhielten Patientinnen und Patienten mit hoher Peptidanzahl meist auch sowohl MHC-Klasse-I- als auch Klasse-II-Peptide, jedoch war die beobachtete Klonalität sowohl in mono- als auch in polyklonalen Mustern unabhängig von der absoluten Peptidanzahl variabel. Dies deutet auf individuelle Unterschiede in der T-Zellantwort und Antigenverarbeitung hin.

Die Analyse offenbarte deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der TCR-Repertoires, sowohl zwischen den einzelnen Patientinnen und Patienten als auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Peptidstimulation. Besonders ausgeprägt war die oligoklonale Expansion bei Patient ALL0402, der eine persistierende Immunantwort gegen das KRAS^{G12V}-Peptid zeigte (Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402).

(A) Immunomonitoring zeigt eine persistierende CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen das KRASG12V-Peptid im Verlauf von 16 Impfungen (V1-V16). (B) Die Klonverteilung des TCR-Repertoires belegt eine oligoklonale Struktur mit Markierung der klonal expandierten, funktionell getesteten TCRs 1, 2 und 3. (C) FACS-basierte Analyse der Zytokinproduktion zeigt eine selektive IL-2- und IFN- γ -Antwort von TCR 2 und TCR 3 nach Stimulation mit KRASG12V, nicht jedoch mit dem KRASWT. (D) Die zytotoxische Aktivität beider TCRs führt zu einer dosisabhängigen Abtötung peptidbeladener BBLs, wobei bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (E:T) von 5:1 eine nahezu vollständige Elimination erreicht wurde. Unbeladene Zellen blieben unbeeinträchtigt. SI = Stimulation Index; berechnet als Verhältnis der Zytokinpositiven Zellen nach Peptidstimulation zur Hintergrundkontrolle (DMSO). A-B). Hier machten die fünf häufigsten TCR-Klone mehr als 50 % der Gesamtpopulation aus – ein Hinweis auf eine dominante klonale Antwort (Tabelle 22).

Demgegenüber zeigten sich bei Patient ALL0112 breite, polyklonale Repertoires, in denen keine dominante Klonexpansion nachweisbar war (Tabelle 15 -Tabelle 18). In den Proben anderer Patientinnen und Patienten – darunter ALL0101, ALL0105 und ALL0401 – konnten sowohl oligoklonale als auch polyklonale Muster beobachtet werden (Tabelle 7 -Tabelle 11 und Tabelle 20 - Tabelle 21).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die klonale Zusammensetzung der TCR-Repertoires sowohl interindividuell als auch peptidspezifisch stark variiert. Während bei einzelnen Patientinnen und Patienten eine fokussierte Expansion spezifischer TCR-Klone beobachtet wurde, wiesen andere ein deutlich breiteres, polyklonales Muster auf. Diese Unterschiede könnten auf individuelle

Ausprägungen der T-Zell-Antwort und die Dynamik der antigenspezifischen Reaktivität hinweisen.

In mehreren Fällen zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen starker funktioneller Immunantwort im Immunmonitoring (hoher Stimulation Index) und der Expansion eines dominanten T-Zellklons in der Einzelzellsequenzierung. Dies betraf insbesondere Patient ALL0106 sowie Patientin ALL0412, bei denen sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-Antworten durch einzelne Peptide ausgelöst wurden.

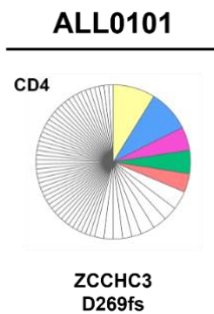


Abbildung 8 Klonverteilung der CD4⁺- T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit dem Peptid ZCCHC3 D269fs.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit einem Peptid aus dem ZCCHC3-Protein (*Zinc finger CCHC-type containing 3*) mit einer frameshift-Mutation an Position D269. Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in Tabelle 7 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit ZCCHC3 D269fsaufgeführt.

Tabelle 7 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0101 nach Stimulation mit ZCCHC3 D269fs.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf häufigsten TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten angegeben. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
9	2	8,82	CASSSSGQDYNSPLHF	CAVRWFQKLVF
9	2	8,82	CAGTGAIYGYTF	n/a
5	2	4,9	CASSLEQAGDDTQYF	CIVRVAVGVQDTAPSP
5	2	4,9	CASSHGGPPNYGYTF	CAVNYNTDKLIF
4	2	3,92	CASSLEQAGDDTQYF	n/a

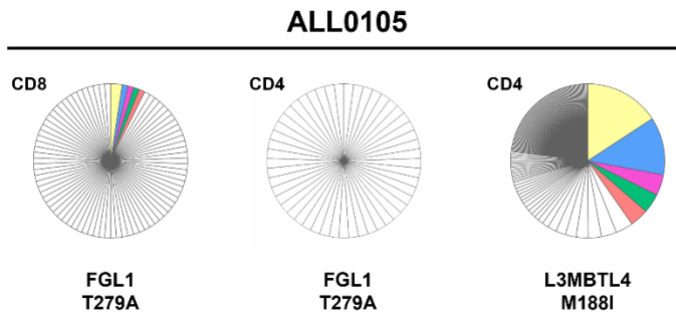


Abbildung 9 Klonverteilung der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit den Peptiden FGL1 T279A und L3MBTL4 M188I.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD8⁺-T-Zellen (links) sowie der CD4⁺-T-Zellen (mittig und rechts) nach Peptidstimulation. FGL1 (*Fibrinogen-like protein 1*) trug eine T279A-Mutation, L3MBTL4 (*Lethal(3) malignant brain tumor-like protein 4*) eine M188I-Mutation. Die fünf am häufigsten TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in Tabelle 8 -Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 8 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺ T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit FGL1 T279A.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf häufigsten TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
2	1	2,44	CSADSARDYNEQFF	CAVELYNQGGKLIF
1	80	1,22	CAISESWTSGANEQFF	CAFMKHGSYNNNDMRF
1	80	1,22	CASGGVNTGELFF	n/a
1	80	1,22	CASGTNYGYTF	n/a
1	80	1,22	CASMGQIYEQYF	n/a

Tabelle 9 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit FGL1 T279A.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf häufigsten TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
1	49	2,04	CASIPETSGLSSYEQYF	CALSEAPDKLIF
1	49	2,04	CASIPTGTSGTLADTQYF	CAVESPETSGSRLTF
1	49	2,04	CASKIGQPNYGYTF	CVGDMYSGGGADGLTF
1	49	2,04	CASKNGGSETQYF	CVHGSSNTGKLIF
1	49	2,04	CASNRPTDYEQYF	CAVDISNYQLIW

Tabelle 10 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0105 nach Stimulation mit L3MBTL4 M188I.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf häufigsten TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
69	1	15,79	CASSIGGGANEQFF	CVVSGAGSYQLTF
53	1	12,13	CASSLVGAGGKETQYF	CASRVN>NNARLMF
19	1	4,35	CASSPVGQGNYGTYF	CASRVN>NNARLMF
18	1	4,12	CASSGQARYLNEKLFF	CAPAQGGKLIF
17	1	3,89	CASRPGQGFMNTEAFF	CALRNNNNARLMF

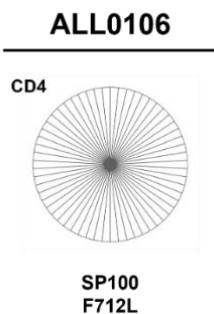


Abbildung 10 Klonverteilung der CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0106 nach Stimulation mit dem Peptid SP100 F712L.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellen nach Peptidstimulation. SP100 (*Speckled protein 100 kDa*) trug eine F712L-Mutation. Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0106 nach Stimulation mit SP100 F712L.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf häufigsten TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
1	58	1,72	CSARMALYEQYF	CAVFNQGGSEKLVF
1	58	1,72	CASSQVMGTEAFF	CAVRQGSNARLMF
1	58	1,72	CASLEGSPTYEQYF	CAVRDKGNTDKLIF
1	58	1,72	CASSYGQGGNTIYF	CAYDGGSQGNLIF
1	58	1,72	CSARQVMNTEAFF	CAVRDIPTGTASKLTF

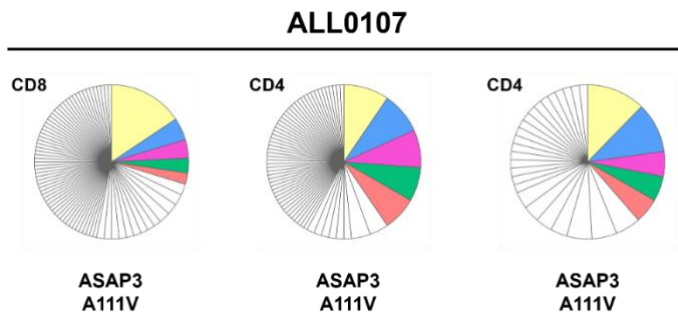


Abbildung 11 Klonverteilung der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der T-Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit ASAP3 (*ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3*), das eine A111V-Mutation aufwies. Links: CD8⁺-T-Zellen zum Zeitpunkt V7; mitte: CD4⁺-T-Zellen zum Zeitpunkt V7; rechts: CD4⁺-T-Zellen zum Zeitpunkt V17. Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabellen 12–14 aufgeführt.

Tabelle 12 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem ASAP3 A111V (Zeitpunkt V7).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
20	1	15,62	CASSQDLGTGGPNEQFF	CAMREGPRNQGGKLIF
6	1	4,69	CASSPSRRTGATGELFF	CAMRLQGAQKLVF
5	1	3,91	CASSSPGQKGKYTF	CVVIRYTGGGNKLTF
4	1	3,12	CASSVGTGTFNEQYF	CAMIIRGAQKLVF
3	5	2,34	CSVETGNFADTQYF	CALDPTSGGSYIPTF

Tabelle 13 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V (Zeitpunkt V7).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
12	1	9,52	CASSSGHRGGNEQFF	CLVASGGGTSYGKLTf
11	1	8,73	CSARGDSNQPQHF	CIVREHGIWKQTGL
10	1	7,94	CAWNRGSGANVLTF	CAASALIEGAQKLVF
9	2	7,14	CSATSSGTPQEQQF	CAAGEHLL
9	2	7,14	CASNRDRSYEQYF	CAASPRNFGNEKLTf

Tabelle 14 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0107 nach Stimulation mit dem Peptid ASAP3 A111V (Zeitpunkt V17).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
7	1	12,28	CASSPHAETQYF	CAEKVDQAGTALIF
6	1	10,53	CSAARGSGRNEQFF	CAGPNQAGTALIF
3	6	5,26	CASSQGSQSSYNSPLHF	CAEKTSGTYKYIF
3	6	5,26	CASSLGWGMGSPLHF	CAYRPPNTGNQFYF
3	6	5,26	CASSWGTGLNTEAFF	CAARETYSGAGSYQLTF

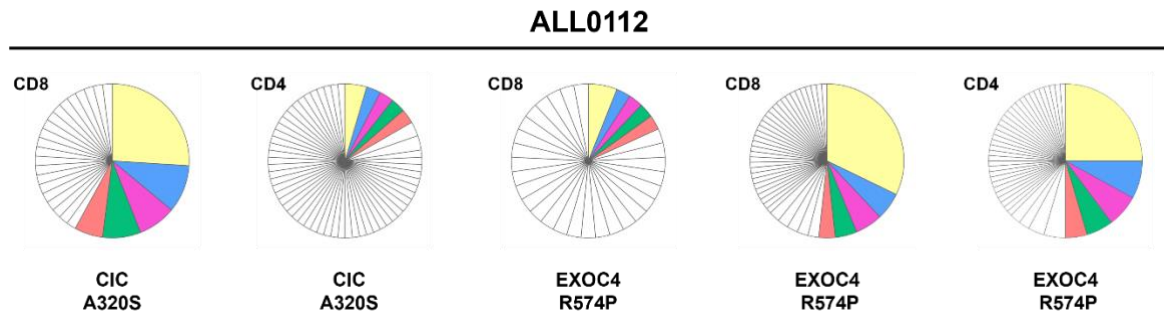


Abbildung 12 Klonverteilung der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit den Peptiden CIC A320S und EXOC4 R574P.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit CIC (*Capicua transcriptional repressor*), das eine A320S-Mutation aufwies, und EXOC4 (*Exocyst complex component 4*) mit einer R574P-Mutation. Von links nach rechts: CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit CIC A320S (V17), CD4⁺-T-Zellen mit CIC A320S (V10), CD8⁺-T-Zellen mit EXOC4 R574P (V12), CD8⁺-T-Zellen mit EXOC4 R574P (V17) sowie CD4⁺-T-Zellen mit EXOC4 R574P (V17). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 15-Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 15 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid CIC A320S (Zeitpunkt V17).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
13	1	26	CAASAQGSSNTGKLIF	CASSQDRRKQYF
5	1	10	CAPSPAAGTASKLTF	CASSQDRRKQYF
4	2	8	CAGALGNKLVF	CAWSGGNEAFF
4	2	8	CLVGGSSNTGKLIF	CASSLVRDLYYNEQFF
3	1	6	CATFHDYKLSF	CASSLAGPDTQYF

Tabelle 16 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid CIC A320S (Zeitpunkt V10).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone innerhalb der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid CIC A320S zum Zeitpunkt V10. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klongröße sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
3	1	4,55	CASSFGLAGEIRSI	n/a
2	6	3,03	CSAPNSGSETQYF	n/a
2	6	3,03	CATSDAPTSTGELFF	CAVADGQKLLF
2	6	3,03	CASSRRPASYEQYF	CALGEDSNYQLIW
2	6	3,03	CASSEISQAHAFF	CILRSGNEKLTFF

Tabelle 17 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit EXOC4 R574P (Zeitpunkt V12).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone innerhalb der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P zum Zeitpunkt V12. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klonegröße sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
2	1	6,06	CASSFIGGARSPLHF	CAVGTGTHNTDKLIF
1	31	3,03	CASSQDRRKQYF	CAASAQGSSNTGKLIF
1	31	3,03	CAWSGGNEAFF	CAGALGNKLVF
1	31	3,03	CATSDLGGAYNEQFF	CAATTSNDYKLSF
1	31	3,03	CASSFRPGPADEQYF	CAVWDSNYQLIW

Tabelle 18 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P (Zeitpunkt V17).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone innerhalb der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P zum Zeitpunkt V17. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klonegröße sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
28	1	32,18	CASSQDRRKQYF	CAASAQGSSNTGKLIF
5	2	5,75	CSARGDSQAGKVGELFF	n/a
5	2	5,75	CASSQDRRKQYF	CAPSPAAGTASKLTF
4	1	4,6	CASSLGYEQYF	CAVFTGGGNKLTFF
3	1	3,45	CASSQDRRKQYF	n/a

Tabelle 19 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0112 nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P (Zeitpunkt V17).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone innerhalb der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid EXOC4 R574P zum Zeitpunkt V17. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klonegröße sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
22	1	25	CASSLSYTGELFF	CAMRESLTGTASKLTF
7	1	7,95	CAISEWSSGGEQFF	CAVSDIQQGAQKLVF
6	1	6,82	CAISGLPGQLIMNTEAFF	CALGGNQGGKLIF
5	1	5,68	CASSLKAGSTDTQYF	CIVRVGGSQGNLIF
4	2	4,55	CASSESILIGYGYTF	CAVRFRRRETSRSLTF

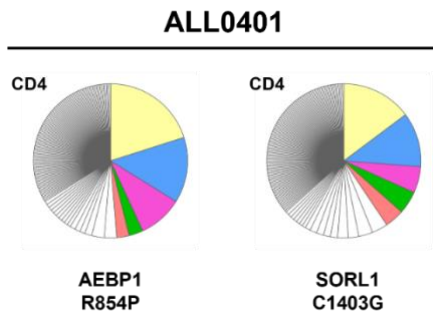


Abbildung 13 Klonverteilung der CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit den Peptiden AEBP1 R854P und SORL1 C1403G.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit AEBP1 (*AE binding protein 1*), das eine R854P-Mutation aufwies (links), und SORL1 (*Sortilin-related receptor 1*) mit einer C1403G-Mutation (rechts). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 20 - 21 aufgeführt.

Tabelle 20 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit dem Peptid AEBP1 R854P.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
40	1	14,76	CASSLTGKGYTF	CALSEARRGAQKLVF
31	1	11,44	CASSLALRKAFF	RSGAGSYQLTF
15	1	5,54	CASSPRALTMETQYF	CVVNMVEALGMCCI
13	1	4,8	CASSSGGQLNEKLFF	CAVRANQQGGKLIF
11	1	4,06	CASVHLTGPEYGYTF	CAVSVTFGNTPLVF

Tabelle 21 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0401 nach Stimulation mit SORL1 C1403G.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
54	1	20,07	CASSPAGQETQYF	CAVRADSWGKQLQF
37	1	13,75	CASSRGAPGGQYF	CAMRGNTGGFKTIF
25	1	9,29	CASGNQGPGLSGANVLTF	CAEYSSASKIIF
8	1	2,97	CASSYSAEGGEQFF	CAVNEAGTYKYIF
7	3	2,6	CASGRGFDTEAFF	CAVERSSGGSNYKLTF

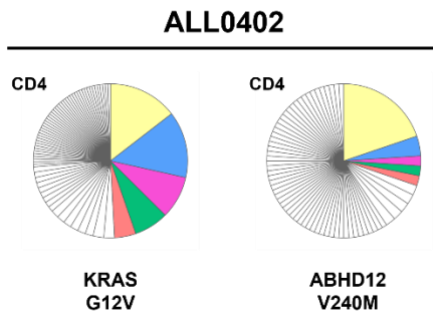


Abbildung 14 Klonverteilung der CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid KRAS G12V und ABHD12 V240M.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit KRAS G12V (links) sowie ABHD12 (*α/β-Hydrolase domain-containing protein 12*), das eine V240M-Mutation aufwies (rechts). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 22 - Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 22 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid KRAS G12V.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
26	1	14,53	CASSLGGGESSGYTF	n/a
25	1	13,97	CASSPAGGPYEQYF	CAVLPMDSSYKLIF
16	1	8,94	CASSSRLAGIYEQYF	CAVNPTNTGNQFYF
13	1	7,26	CASSLGGGRKFWLHL	n/a
8	1	4,47	CASSQGWEGRELF	CAANNNAGNMLTF

Tabelle 23 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0402 nach Stimulation mit dem Peptid ABHD12 V240M.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
19	1	19,79	CASSLGFEAAFF	CAYRFPRGSQGNLIF
4	1	4,17	CASSQGLPKNIQYF	CAARTLRGTYKYIF
2	7	2,08	CASSLGRNTEAFF	CAPPFGGGFKTIF
2	7	2,08	CASSQVGGGYGYTF	CVVTWGNTNAGKSTF
2	7	2,08	CATSRDLRFNEKLFF	CAVSEFQGAQQLVF

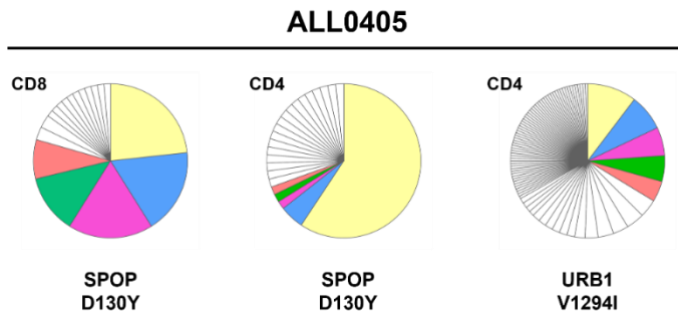


Abbildung 15 Klonverteilung der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit den Peptiden SPOP D130Y und URB1 V1294I.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der T-Zellen nach Stimulation mit SPOP (*Speckle-type POZ protein*), das eine D130Y-Mutation aufwies (links: CD8⁺-T-Zellen; Mitte: CD4⁺-T-Zellen), sowie mit URB1 (*URB1 ribosome biogenesis 1 homolog*), das eine V1294I-Mutation aufwies (rechts: CD4⁺-T-Zellen). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 24 -Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 24 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem Peptid SPOP D130Y.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
17	1	23,29	CATSRDRQGTDTQYF	CARYNAGNMLTF
13	1	17,81	CASSLSEPTGPQHF	CAAYSGAGSYQLTF
13	1	17,81	CASRDLLTHTGELFF	CVVRWGLGGYQKVTF
9	1	12,33	CASSQDFSGNTDTQYF	CAGGFQKLVF
6	1	8,22	CASSEPAGTGAGELFF	CAVRDSGGYQKVTF

Tabelle 25 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem Peptid SPOP D130Y.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
35	1	59,32	CASSLSYEQYF	CAMSVGFGNVLHC
3	1	5,08	CASSLDSSGNTIYF	CAVRPMTTDSWGKLF
1	21	1,69	CASRVGTGTGFGYTF	CAARPYNTDKLIF
1	21	1,69	CASSPSNQPQHF	CAEKRDDYKLSF
1	21	1,69	CASSQPLAGDYEYF	CAGARYGNKLVF

Tabelle 26 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0405 nach Stimulation mit dem URB1 V1294I.

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
19	1	10,33	CASSSGWDTGELFF	CAVKAGNNRKLIV
14	1	7,61	CASSRGLAASSYNEQFF	CILRDVTSNFGNEKLTF
11	1	5,98	CASRDFPNGYTF	CALVNNP*CRQHAHL
10	1	5,43	CASSQVPKGGTEAFF	CAVRDLRLWGTDSWGKLF
8	1	4,35	CASSLAWLLASTISYNEQFF	n/a

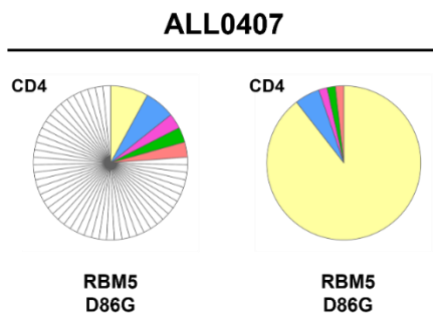


Abbildung 16 Klonverteilung der CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem Peptid RBM5 D86G.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit RBM5 (*RNA binding motif protein 5*), das eine D86G-Mutation aufwies. Links: Klonverteilung zum Zeitpunkt V7; rechts: Klonverteilung zum späteren Zeitpunkt V10. Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 27 - Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 27 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem Peptid RBM5 D86G (Zeitpunkt V7).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
5	1	7,94	CASSLTGRAGEQFF	n/a
4	1	6,35	CASHGQGLNQPQHF	n/a
2	3	3,17	CASGRIYGYTF	CAVGETSGSRLTF
2	3	3,17	CSARKPPGPQHF	n/a
2	3	3,17	CSAAGTGYEKLFF	CAVGASFQKLVF

Tabelle 28 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0407 nach Stimulation mit dem RBM5 D86G (Zeitpunkt V10).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
51	1	89,47	CSAIAGTGRTEAFF	CAVRANRGNTPLVF
3	1	5,26	CASSGQGTYNQFF	CVVSDRGSTLGRLYF
1	3	1,75	CASSASGTNNYGYTF	CAVSSPSGGSYIPTF
1	3	1,75	CASSLAGGSYEQYF	CALSEAETGANNLFF
1	3	1,75	CASSLPGLSGNTIYF	CAVEAPPGNKLTF

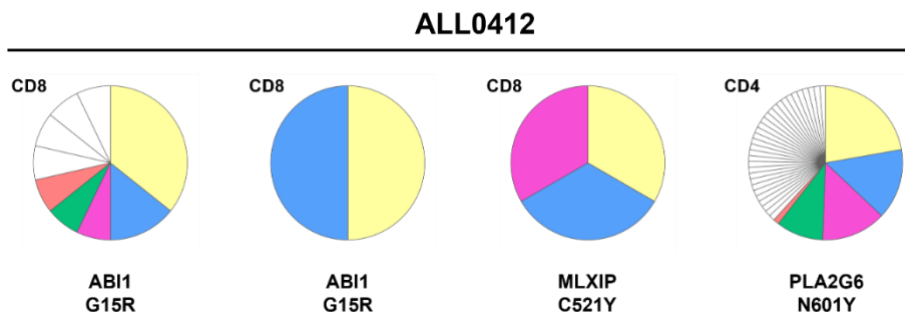


Abbildung 17 Klonverteilung der CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit den Peptiden ABI1 G15R, MLXIP C521Y und PLA2G6 N601Y.

Dargestellt ist die klonale Zusammensetzung der T-Zellen nach Stimulation mit Peptiden aus den Proteinen ABI1 (*Abl interactor 1*, G15R-Mutation), MLXIP (*MLX interacting protein*, C521Y-Mutation) und PLA2G6 (*Phospholipase A2 group VI*, N601Y-Mutation). Von links nach rechts: CD8⁺-T-Zellen mit ABI1 G15R (Zeitpunkt V10), CD8⁺-T-Zellen mit ABI1 G15R (V11), CD8⁺-T-Zellen mit MLXIP C521Y (V12) sowie CD4⁺-T-Zellen mit PLA2G6 N601Y (V17). Die fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sind farblich hervorgehoben, alle übrigen Klone in Grau dargestellt. Die korrespondierenden CDR3-Sequenzen der dominanten Klone sind in den Tabelle 29 - Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 29 Häufigste TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid ABI1 G15R (Zeitpunkt V10).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone innerhalb der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit ABI1 G15R zum Zeitpunkt V10. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klongröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klongröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
5	1	35,71	CATSALTGYEQFF	CAEILNTGRRALTF
2	1	14,29	CASSPPTKETQYF	CAFRNSVSGTYKYIF
1	1	7,14	CASSPRGGGNTGELFF	CAMREWNTGNQFYF
1	1	7,14	CSAPNSGSETQYF	n/a
1	7	7,14	CASSFGLAGEIRSI	n/a

Tabelle 30 TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid AB11 G15R (Zeitpunkt V11).

Dargestellt sind die CDR3 β -Sequenzen der beiden detektierten TCR-Klone innerhalb der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit AB11 G15R zum späteren Zeitpunkt V11. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
1	1	50	CASSLYEGLADMFSYNEQFF	n/a
1	1	50	CASLLAGNEQFF	n/a

Tabelle 31 TCR-Klone in CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid MLXIP C521Y (Zeitpunkt V12).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der drei detektierten TCR-Klone innerhalb der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid MLXIP C521Y zum Zeitpunkt V12. Zusätzlich aufgeführt sind die relative Häufigkeit, die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
1	1	33,33	CASSPAGIVYEQYF	n/a
1	1	33,33	n/a	CIVTERYGGSQGNLIF
1	1	33,33	n/a	CAGAANSSGGSNYKLTF

Tabelle 32 Häufigste TCR-Klone in CD4⁺-T-Zellen von Patient ALL0412 nach Stimulation mit dem Peptid PLA2G6 N601Y (Zeitpunkt V17).

Dargestellt sind die CDR3 α - und CDR3 β -Sequenzen der fünf am häufigsten vertretenen TCR-Klone sowie deren relative Häufigkeit innerhalb der analysierten Zellpopulation. Zusätzlich aufgeführt sind die absolute Klonegröße (Anzahl der Zellen mit identischer Sequenz) sowie die Anzahl unterschiedlicher Klonvarianten. n/a = entsprechende Sequenz konnte nicht bestimmt werden.

Klonegröße	Klonanzahl	Häufigkeit (%)	CDR3 α	CDR3 β
18	1	22,22	CAWSRLDLLGQYF	n/a
12	1	14,81	CSATDRPEQFF	CAVEDHGGSQGNLIF
11	1	13,58	CASSRLADTQYF	CAMSDRGSTLGRLYF
8	1	9,88	CASSHGGDRMNTEAFF	n/a
1	32	1,23	CASSHGGDRMNTEAFF	CAYSAYGAGSYQLTF

3.2 Etablierung des OTR-Systems in Tübingen

3.2.1 Ziel der Methodenetablierung

Die OTR-Technologie stellt eine essenzielle Methode zur gezielten funktionellen Testung von T-Zell-Rezeptoren dar. Diese Methode wurde ursprünglich in München etabliert und uns im Rahmen der Kooperation freundlicherweise demonstriert. In dieser Arbeit wurde das OTR-System anschließend in Tübingen adaptiert und etabliert, um transgene TCRs unabhängig von Primärzellkulturen in einem standardisierten, reporterbasierten Zellmodell zu analysieren.

Ziel der Methodenetablierung in Tübingen war es, die Effizienz der CRISPRn-vermittelten TCR-Integration zu bewerten, die Sortierung der editierten Zellen mithilfe des *Tyto*[®] *Cell Sorter* zu optimieren und die funktionelle Validität der generierten TCR-Jurkat-Zellen zu überprüfen. Diese methodische Grundlage war essenziell für die eigenständige Untersuchung von TCR-Kandidaten, darunter sowohl TCRs aus der IVAC-ALL/AN-Studie als auch TCRs aus anderen Kontexten wie einem Heilversuch. Während in München die funktionelle Validierung der IVAC-ALL-TCRs mittels OTR durchgeführt wurde, diente die parallele Etablierung in Tübingen dazu, die Technik in das bestehende Methodenspektrum zu integrieren und eigenständig anzuwenden.

3.2.2 CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration und anschließende Sortierung mittels Tyto

Die CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration stellte einen zentralen Schritt bei der Implementierung des OTR-Systems dar. Ziel war es, einen transgenen TCR in den TRAC-Lokus zu integrieren und gleichzeitig den endogenen TCR durch gezielte Mutation im TRBC-Lokus auszuschalten. Um diesen *Knock-out-Knock-in*-Prozess effizient umzusetzen, wurde ein optimiertes CRISPRn-Protokoll angewendet, das spezifische sgRNAs für die Deletion des endogenen TCRs sowie für die gezielte Integration des transgenen TCRs enthielt. Nach der Geneditierung wurden die Zellen für 48 Stunden in Kultur gehalten, um die Expression des transgenen TCRs zu ermöglichen.

Die Effizienz der Editierung wurde anschließend durch FACS-Analysen überprüft, indem die Expression des transgenen TCRs anhand des murinen Konstantteils (mTRBC) sowie im Vergleich zum endogenen humanen TCRs (hTCR) detektiert

wurde. Dabei konnten drei distinkte Zellpopulationen identifiziert werden: Zellen mit erfolgreicher Editierung, die ausschließlich den transgenen TCR mit muriner Konstante exprimierten (hTCR-/mTRBC⁺), Zellen mit unvollständiger Editierung, die sowohl den endogenen TCR (hTCR⁺) als auch den transgenen TCR (mTRBC⁺) exprimierten, sowie Zellen ohne erfolgreiche Editierung, die ausschließlich den endogenen TCR exprimierten (hTCR⁺/mTRBC⁻). Diese Unterschiede in der Editierungseffizienz waren in den FACS-Plots deutlich sichtbar.

Um eine hochreine Population transgener TCR-positiver Zellen zu erhalten, wurde nach der Geneditierung eine Selektion mittels Tyto-Zellsortierung durchgeführt. Die optimierten Sortierparameter führten zu einer signifikanten Anreicherung der Zellen mit erfolgreicher Editierung, was sich in einer Erhöhung des Anteils hTCR-negativer, mTRBC-positiver Zellen widerspiegelte. Die FACS-Analyse nach der Sortierung bestätigte die hohe Effizienz des OTR-Ansatzes sowie die Reinheit der angereicherten Zellpopulationen.

Neben den editierten Jurkat-TPR-Zellen wurden auch Kontrollpopulationen analysiert, darunter uneditierte Jurkat-TPR-Zellen als Negativkontrolle sowie Zellen, die mit einem unspezifischen Kontroll-TCR editiert wurden. Diese Kontrollgruppen dienten dazu, mögliche unspezifische Effekte auszuschließen und die Spezifität der genetischen Modifikation zu bestätigen. Die FACS-Analysen zeigten, dass ausschließlich korrekt editierte Zellen eine zuverlässige Signalweiterleitung über den transgenen TCR vermittelten, was die funktionelle Relevanz des OTR-Ansatzes weiter untermauerte.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen, die in Abbildung 18 FACS-Analyse der TCR-Expression vor und nach der Selektion mittels Tyto-Sortierung.

Dargestellt sind exemplarisch verschiedene TCR-Kandidaten, die mittels OTR in Jurkat-TPR-Zellen integriert wurden: ALL0107 CD4 und ALL0107 CD8 stammen aus CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0107, AR P3-6 sowie AR P4-4/P5-7 wurden aus einem individuellen Heilversuch bei hepatozellulärem Karzinom (HCC) generiert, EBV repräsentiert einen literaturbasierten, EBV-spezifischen Kontroll-TCR. Die obere Reihe zeigt die Expression von CD4 oder CD8 gegen den murinen TCR β -Kettenmarker (mTRBC) in den unterschiedlichen TCR-Kandidaten vor der Sortierung. In der mittleren Reihe sind die FACS-Daten zur Expression des humanen TCRs (hTCR) im Vergleich zum transgenen TCR (mTRBC) vor der Sortierung dargestellt. Es lassen sich drei Populationen unterscheiden: Zellen mit erfolgreichem Knock-in (hTCR⁻, mTRBC⁺), Zellen mit unvollständigem Austausch (hTCR⁺, mTRBC⁺) und Zellen ohne erfolgreiche Editierung (hTCR⁺, mTRBC⁻). In der unteren Reihe ist die Expression des transgenen TCRs (mTRBC) nach der

Sortierung mittels Tyto zu sehen. Die Selektion führte zu einer signifikanten Anreicherung der korrekt editierten TCR-positiven Zellen, was die Effizienz des OTR-Prozesses bestätigt. Dargestellt sind, verdeutlichen den erfolgreichen *Knock-out* des humanen TCRs und die effiziente Integration des transgenen TCRs (mTRBC). Die obere Reihe zeigt die Expression von CD4 oder CD8 gegen mTRBC in den unterschiedlichen TCR-Kandidaten. In der mittleren Reihe ist die Expression des hTCR gegen mTRBC abgebildet, was die unterschiedlichen Grade der CRISPRn-Editierung aufzeigt. Während einige Zellen erfolgreich editiert wurden und ausschließlich mTRBC exprimierten, fanden sich auch Zellen mit Koexpression von hTCR und mTRBC sowie solche, die nur den hTCR exprimierten. Die untere Reihe zeigt die Expression des mTCRs nach der Sortierung, wobei eine signifikante Anreicherung der erfolgreich editierten Zellen sichtbar wird. Dies belegt, dass die Kombination aus CRISPRn-Editierung und Tyto-Selektion eine zuverlässige Methode zur Generierung homogener transgener TCR-Zellpopulationen darstellt und die Grundlage für nachfolgende funktionelle Analysen bildet.

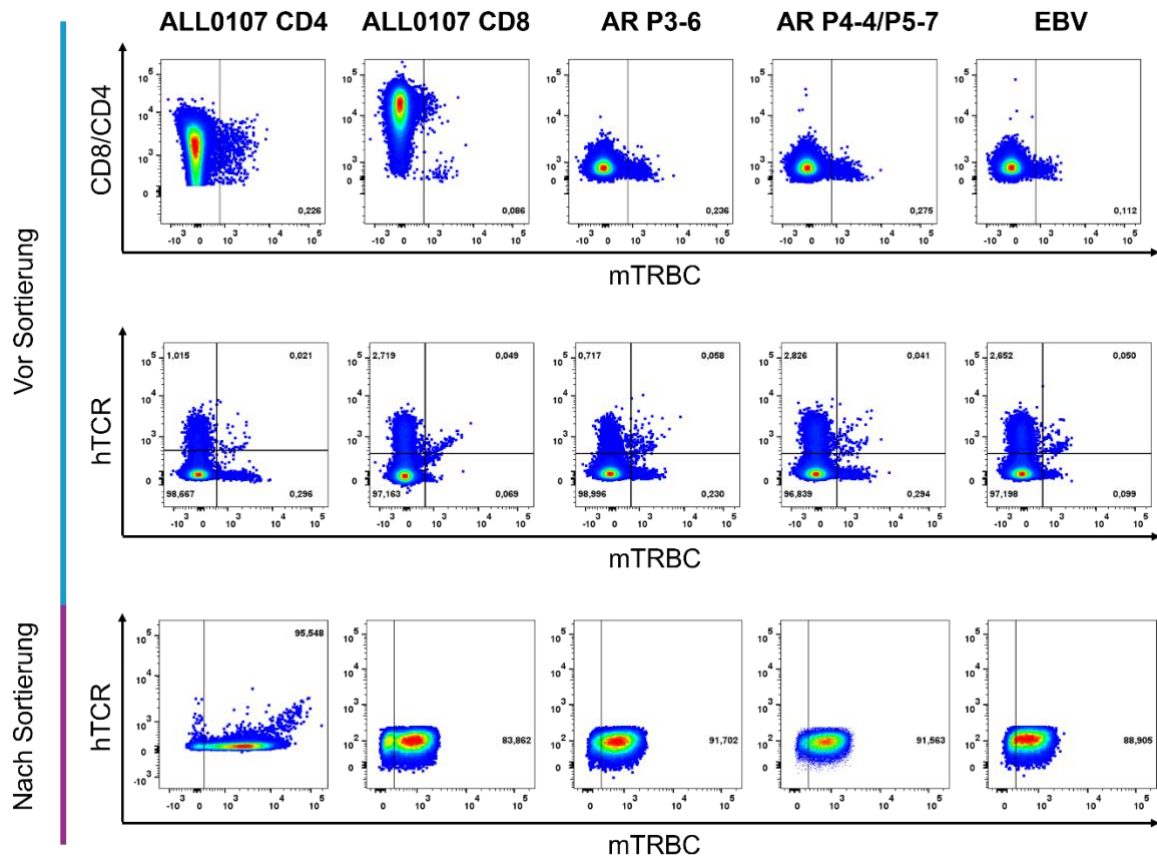


Abbildung 18 FACS-Analyse der TCR-Expression vor und nach der Selektion mittels Tyto-Sortierung.

Dargestellt sind exemplarisch verschiedene TCR-Kandidaten, die mittels OTR in Jurkat-TPR-Zellen integriert wurden: ALL0107 CD4 und ALL0107 CD8 stammen aus CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen von Patient ALL0107, AR P3-6 sowie AR P4-4/P5-7 wurden aus einem individuellen Heilversuch bei hepatozellulärem Karzinom (HCC) generiert, EBV repräsentiert einen literaturbasierten, EBV-spezifischen Kontroll-TCR. Die obere Reihe zeigt die Expression von CD4 oder CD8 gegen den murinen TCR β -Kettenmarker (mTRBC) in den unterschiedlichen TCR-Kandidaten vor der Sortierung. In der mittleren Reihe sind die FACS-Daten zur Expression des humanen TCRs (hTCR) im Vergleich zum transgenen TCR (mTRBC) vor der Sortierung dargestellt. Es lassen sich drei Populationen unterscheiden: Zellen mit erfolgreichem *Knock-in* (hTCR⁻, mTRBC⁺), Zellen mit unvollständigem Austausch (hTCR⁺, mTRBC⁺) und Zellen ohne erfolgreiche Editierung (hTCR⁺, mTRBC⁻). In der unteren Reihe ist die Expression des transgenen TCRs (mTRBC) nach der Sortierung mittels Tyto zu sehen. Die Selektion führte zu einer signifikanten Anreicherung der korrekt editierten TCR-positiven Zellen, was die Effizienz des OTR-Prozesses bestätigt.

3.2.3 Funktionelle Validierung der generierten OTR-TCRs

Nach erfolgreicher Editierung und Selektion transgener Jurkat-TPR-Zellen wurde die funktionelle Validierung der generierten TCRs durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, die Antigen-spezifität und Signaltransduktionsfähigkeit der exprimierten TCRs in einem Peptid-spezifischen Kokulturmodell zu analysieren.

Hierzu wurden mittels OTR modifizierte Jurkat-TPR-Zellen mit Tumorzelllinien (MCF-7 beziehungsweise Nalm6) als APCs ko-kultiviert, die HLA-A*02:01 sowie teilweise auch HLA-Klasse-II-Moleküle exprimieren. Die APCs wurden entweder mit dem jeweiligen Impfpeptid oder einem HLA-A*02:01-kompatiblen Kontrollpeptid (ALK-abgeleitet, Sequenz: SLAMDLLHV) beladen, das nicht dem jeweiligen Impfpeptid entsprach. Ziel war es, eine antigenspezifische TCR-Aktivierung durch das Impfpeptid nachzuweisen und potenzielle Hintergrundsignale mithilfe des Kontrollpeptids abzugrenzen.

Zur Standardisierung der Testbedingungen wurde das ALK-Kontrollpeptid in allen Kokulturen eingesetzt – auch bei TCR-Kandidaten mit vermuteter MHC-Klasse-II-Restriktion. Obwohl es ausschließlich über MHC-Klasse-I-Restriktion präsentiert wird, erlaubte es eine vergleichbare Einschätzung unspezifischer Reaktivitäten.

Tabelle 33 Verwendete Zelllinien zur funktionellen Testung der transgenen Jurkat-TPR-Zellen.

Zelllinie	MHC-Klasse I	MHC-Klasse II	Getestete TCR-Kandidaten
Nalm6	A*02:01 (A*01:01)	n/a	AR P3-6 AR4 P4-4/P5-7 ALL0107 (CD8) EBV
MCF-7	A*02:01	DQB1*06:02 DRB1*13 DRB1*15:01	AR P3-6 AR4 P4-4/P5-7 ALL0107 (CD8 & CD4) EBV

Die Aktivierung der transgenen Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand der Reporter-Signale für NF- κ B (eCFP) und NFAT (eGFP) analysiert. Eine exemplarische Darstellung der Ergebnisse für den TCR-Kandidaten AR P4-4 beziehungsweise P5-7 ist in Abbildung 19 Aktivierung gecrispter TCR-T-Zellen (AR P4-4/P5-7) nach Kokultur mit Peptid-beladenen MCF-7-Zellen.

Jurkat-TPR-Zellen mit AR P4-4/P5-7-TCR wurden mit HLA-A*02:01-positiven MCF-7-Zellen kokultiviert, die entweder mit einem HLA-A*02:01-kompatiblen Kontrollpeptid (links) oder dem passenden Impfpeptid (mittig) beladen wurden. Gezeigt ist die Aktivierung der Reporter NF κ B (BV510) und NFAT (FITC). Im Overlay (rechts) sind beide Bedingungen zum direkten Vergleich

übereinandergelegt. Das gezeigte Beispiel veranschaulicht die spezifische Aktivierung durch das Impfpeptid, gezeigt. Dort zeigt sich eine deutliche Aktivierung in der Impfpeptid-Bedingung, während die Reaktion auf das Kontrollpeptid deutlich geringer ausfiel. Eine konsistente und reproduzierbare Aktivierung wurde für AR P4-4/P5-7 sowohl nach Kokultur mit MCF-7- als auch mit Nalm6-Zellen beobachtet. Die TCRs AR P4-4 und AR P5-7 entsprachen demselben Sequenztyp und wurden unabhängig voneinander identisch sequenziert. In den funktionellen Analysen werden sie daher als ein gemeinsamer TCR dargestellt.

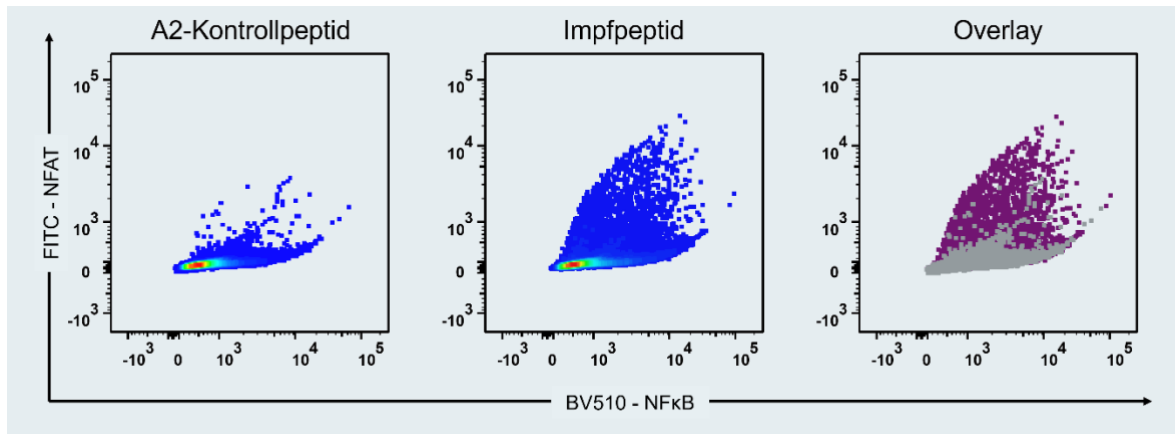


Abbildung 19 Aktivierung gecrispter TCR-T-Zellen (AR P4-4/P5-7) nach Kokultur mit Peptid-beladenen MCF-7-Zellen.

Jurkat-TPR-Zellen mit AR P4-4/P5-7-TCR wurden mit HLA-A*02:01-positiven MCF-7-Zellen kokultiviert, die entweder mit einem HLA-A*02:01-kompatiblen Kontrollpeptid (links) oder dem passenden Impfpeptid (mittig) beladen wurden. Gezeigt ist die Aktivierung der Reporter NFκB (BV510) und NFAT (FITC). Im Overlay (rechts) sind beide Bedingungen zum direkten Vergleich übereinandergelegt. Das gezeigte Beispiel veranschaulicht die spezifische Aktivierung durch das Impfpeptid.

Schwache, grenzwertige Signale wurden bei AR P3-6 sowie bei ALL0107 (CD4 und CD8) in der Kokultur mit MCF-7 beobachtet. Für Nalm6 konnten bei diesen TCRs hingegen keine klaren Aktivierungssignale detektiert werden, was möglicherweise auf Unterschiede in der Peptidpräsentation oder den HLA-Kontext zurückzuführen ist.

Die Reporter-Signale für NFAT (eGFP) wurden über den FITC-Kanal zuverlässig detektiert. Die Erfassung des NF-κB-Reporters (eCFP) war hingegen durch die Filterkonfiguration des verwendeten Geräts (BD LSRFortessa™) technisch eingeschränkt. Da das Emissionsmaximum von eCFP zwischen den verfügbaren BV421- und BV510-Filtern liegt, konnten insbesondere schwache Signale nicht adäquat erfasst werden. Zwar waren starke Aktivierungen visuell nachvollziehbar, eine quantitative Auswertung der NF-κB-Aktivierung war jedoch nur eingeschränkt

möglich. Eine spektrale Kompensation war nicht durchführbar, da die Reporter in den Jurkat-TPR-Zellen konstitutiv exprimiert werden und daher keine definierbaren Single-Positive-Kontrollen zur Verfügung standen.

Zusätzlich zur Reporter-basierten Aktivierungsanalyse wurde der TCR AR P4-4/P5-7 in einer unabhängigen Versuchsreihe mittels Tetramerfärbung auf seine spezifische Bindung an den korrespondierenden Peptid-MHC-Komplex überprüft. Zum Einsatz kamen Flex-T™-Tetramere mit APC- beziehungsweise PE-konjugierter Streptavidin-Komponente, die durch UV-induzierte Peptidladung mit dem relevanten Impfpeptid versehen worden waren.

In der Impfpeptid-basierten Positivbedingung konnte eine deutlich abgegrenzte doppelt tetramerpositive Population im Q2-Quadranten (APC^+/PE^+) detektiert werden, was auf eine spezifische Bindung des exprimierten TCRs an den Peptid-MHC-Komplex hinweist. In den Kontrollbedingungen – ohne Tetramierzugabe beziehungsweise mit einem Tetramer, das mit einem nicht relevanten Kontrollpeptid beladen war – war hingegen kein nennenswertes Signal nachweisbar. Damit bestätigt die Tetramerfärbung die Antigen-spezifität des TCRs AR P4-4/P5-7 zusätzlich zur funktionellen Aktivierung in der Reporteranalyse. Eine grafische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 20 Tetramerfärbung zur Validierung der Peptidbindung durch den TCR AR P4-4/P5-7.

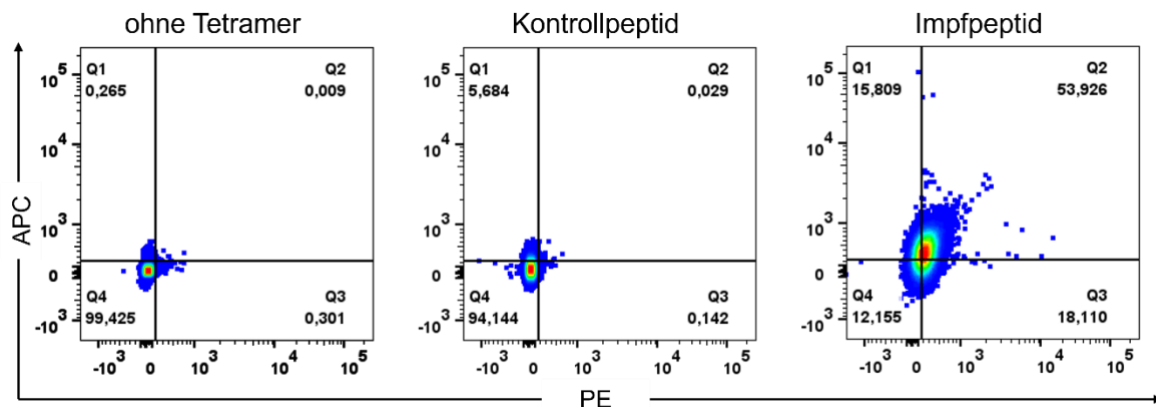


Abbildung 20 Tetramerfärbung zur Validierung der Peptidbindung durch den TCR AR P4-4/P5-7.

Jurkat TPR Zellen, die mittels OTR den TCR AR P4-4/P5-7 exprimieren, wurden mit HLA-A*02:01-Tetrameren gefärbt, die jeweils mit dem relevanten Impfpeptid oder einem nicht relevanten Kontrollpeptid beladen und mit PE beziehungsweise APC konjugiert waren. Dargestellt sind drei Bedingungen: Zellen ohne Tetramierzugabe (links), Färbung mit einem Kontrollpeptid-beladenen Tetramer (mittig) sowie die Positivbedingung mit dem Impfpeptid-beladenen Tetramer (rechts). Eine spezifische Population doppelt tetramerpositiver Zellen (Q2: PE^+/APC^+) ist ausschließlich in der Impfpeptid-Bedingung nachweisbar. In den Kontrollbedingungen war kein entsprechendes Signal detektierbar.

Jurkat TPR Zellen, die mittels OTR den TCR AR P4-4/P5-7 exprimieren, wurden mit HLA-A*02:01-Tetrameren gefärbt, die jeweils mit dem relevanten Impfpeptid oder einem nicht relevanten Kontrollpeptid beladen und mit PE beziehungsweise APC konjugiert waren. Dargestellt sind drei Bedingungen: Zellen ohne Tetramierzugabe (links), Färbung mit einem Kontrollpeptid-beladenen Tetramer (mittig) sowie die Positivbedingung mit dem Impfpeptid-beladenen Tetramer (rechts). Eine spezifische Population doppelt tetramerpositiver Zellen (Q2: PE⁺/APC⁺) ist ausschließlich in der Impfpeptid-Bedingung nachweisbar. In den Kontrollbedingungen war kein entsprechendes Signal detektierbar. Eine spektrale Kompensation der beiden Kanäle war technisch nicht durchführbar, da konstitutiv tetramerbindende Zellen keine klassischen Single-positive-Kontrollen erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das OTR-System erfolgreich in Tübingen etabliert. CRISPR-Cas9-editierte Jurkat-TPR-Zellen mit transgenen TCRs wurden generiert, mittels Tyto-Selektion angereichert und in einem Reporter-basierten Assay auf ihre Peptidreaktivität hin untersucht. Die funktionelle Validierung der IVAC-AN-TCRs erfolgte im Rahmen einer kooperativen Testung in München. Die in Tübingen etablierten experimentellen Schritte bilden die Grundlage für eine unabhängige Anwendung der Methode in zukünftigen Projekten.

3.3 Funktionelle Charakterisierung transgener, neoantigenspezifischer TCRs in Jurkat-TPR-Zellen

3.3.1 Funktionelle Validierung der IVAC-ALL-1 TCRs mittels OTR

Nach der Einzelzellsequenzierung impfstoffreaktiver CD154⁺- und IFN γ ⁺-T-Zellen aus der IVAC-ALL-1-Studie wurden ausgewählte TCR-Kandidaten zur funktionellen Validierung an die Münchner Kooperationsgruppe übermittelt. Alle getesteten TCRs stammten aus den in Tübingen expandierten, sortierten und sequenzierten T-Zellen. Die in München durchgeführten Experimente zielten darauf ab, die Antigenpezifität sowie die Funktionalität der transgenen T-Zellen zu charakterisieren.

Die TCRs wurden mittels OTR in Jurkat-TPR-Zellen exprimiert, welche Reporter für NF κ B (eCFP) und NFAT (eGFP) enthalten. Diese Reporter ermöglichen eine

sensitive Detektion der TCR-vermittelten Signaltransduktion nach Antigenstimulation. Die TCR-exprimierenden Jurkat-Zellen wurden mit HLA-kompatiblen, antigenpräsentierenden, CD40-stimulierten B-Zell-Blasten (BBL) ko-kultiviert. Letztere wurden entweder mit dem jeweiligen Impfpeptid oder unbehandelt verwendet.

Da es sich bei den ALL-Patienten um vollständige Chimären nach Stammzelltransplantation handelte, war eine eindeutige Zuordnung der TCRs zum Spender- beziehungsweise Empfänger-Genotyp methodisch relevant. Aufgrund begrenzter Materialverfügbarkeit wurden zur Generierung der BBLs teilweise PBMCs gesunder Spenderinnen und Spender mit partieller HLA-Kompatibilität verwendet.

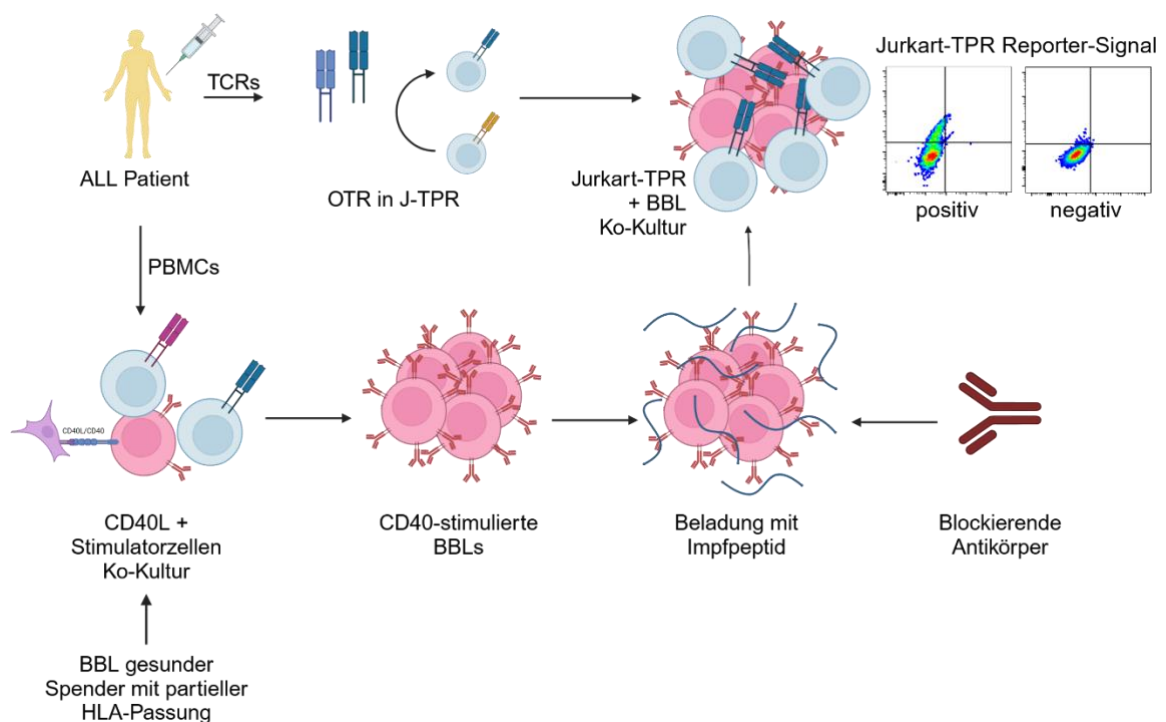


Abbildung 21 Experimenteller Aufbau zur funktionellen Überprüfung impfinduzierter TCRs in München.

Nach orthotopischem TCR-Replace (OTR) in Jurkat-TPR-Zellen wurden die Reporter-Zellen mit CD40-stimulierten B-Blasten (BBLs) ko-kultiviert, die mit oder ohne das jeweilige Impfpeptid beladen wurden. Die BBLs stammten entweder von den jeweiligen Patienten oder – bei unzureichender Materialverfügbarkeit – von gesunden Spendern mit partieller HLA-Kompatibilität. Zur Überprüfung der HLA-Restriktion kamen blockierende Antikörper gegen HLA-DR, -DQ, -DP sowie pan-MHC-I zum Einsatz. Die Aktivierung der Reporter NFAT und NFkB diente als funktioneller Nachweis der TCR-vermittelten Antigenerkennung.

3.3.1.1 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs (Patient ALL0402)

Besondere Aufmerksamkeit erhielt die funktionelle Validierung der TCR-Kandidaten aus Patient ALL0402, da bei diesem Patienten eine persistierende CD4⁺-T-Zell-Antwort gegen das KRAS^{G12V}-abgeleitete Peptid beobachtet wurde. Diese punktuelle Mutation ist in verschiedenen soliden Tumoren, insbesondere in Pankreas-, Lungen- und Kolonkarzinomen, häufig präsent [181].

Um die Antigen-spezifität und funktionelle Aktivität der TCRs zu überprüfen, wurden drei TCR-Kandidaten (TCR 1, TCR 2 und TCR 3) mittels OTR in Jurkat-TPR-Zellen exprimiert. Die resultierenden transgenen T-Zellen wurden anschließend mit HLA-kompatiblen, CD40-stimulierten BBL ko-kultiviert, die entweder mit KRAS^{G12V}-Peptid beladen oder nicht beladen wurden.

Die funktionelle Charakterisierung der TCR-Kandidaten zeigte deutliche Unterschiede in der Antigen-spezifität. Während TCR 1 keine Aktivierung aufwies, reagierten sowohl TCR 2 als auch TCR 3 spezifisch auf KRAS^{G12V}-Peptid-beladene B-Zell-Blasten. Die Aktivierung der TCR-positiven Jurkat-TPR-Zellen wurde durch die Expression der Reporter für NFκB und NFAT erfasst. Abbildung 22 Funktionelle Aktivierung von Jurkat-Reporterzellen, die TCR 3 (KRAS G12V) exprimieren.

Gezeigt wird eine exemplarische Aktivierung der Reporter NFκB (eCFP) und NFAT (eGFP) nach Ko-Kultivierung mit B-Zell-Blasten (BBL): Nur KRASG12V-beladene BBL induzieren eine deutliche Signalantwort, während unbeladene BBL keine Aktivierung hervorrufen. Links sind unstimulierte Jurkat-Zellen sowie PMA/Ionomycin-stimulierte Zellen als Kontrolle dargestellt, rechts die Ko-Kulturen mit unbeladenen versus KRASG12V-beladenen BBL. zeigt exemplarisch die Aktivierung von TCR 3, der nach Ko-Kultivierung mit peptidbeladenen B-Zell-Blasten eine deutliche Induktion der Reporter-Signale zeigte, während bei unbeladenen B-Zell-Blasten keine signifikante Aktivierung beobachtet wurde. Die positive Kontrolle mit PMA/Ionomycine, das zu einer unspezifischen starken T-Zellaktivierung durch Stimulation der Proteinkinase C führt, bestätigte die allgemeine Funktionalität des Reportersystems.

TCR 3 KRAS G12V

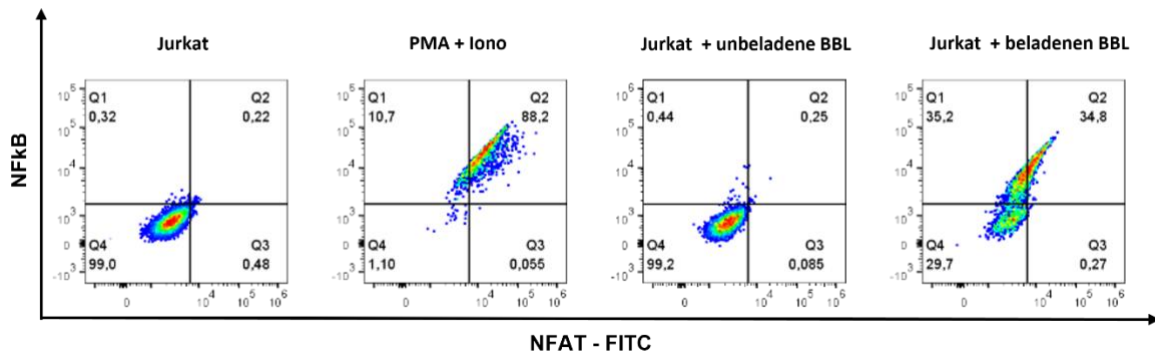


Abbildung 22 Funktionelle Aktivierung von Jurkat-Reporterzellen, die TCR 3 (KRAS G12V) exprimieren.

Gezeigt wird eine exemplarische Aktivierung der Reporter NFkB (eCFP) und NFAT (eGFP) nach Ko-Kultivierung mit B-Zell-Blasten (BBL): Nur KRAS^{G12V}-beladene BBL induzieren eine deutliche Signalantwort, während unbeladene BBL keine Aktivierung hervorrufen. Links sind unstimulierte Jurkat-Zellen sowie PMA/Ionomycin-stimulierte Zellen als Kontrolle dargestellt, rechts die Ko-Kulturen mit unbeladenen versus KRAS^{G12V}-beladenen BBL.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurden Zytokinanalysen durchgeführt, um die durch die TCR-Antigen-Interaktion induzierte Immunantwort zu bewerten. Die Quantifizierung der IL-2- und IFN γ -produzierenden TCR 2- und TCR 3-positiven Zellen zeigte eine spezifische Reaktion auf KRAS^{G12V}, während keine signifikante Antwort auf das Wildtyp-Peptid KRAS^{WT} detektiert wurde. Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402.

(A) Immunomonitoring zeigt eine persistierende CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen das KRASG12V-Peptid im Verlauf von 16 Impfungen (V1-V16). (B) Die Klonverteilung des TCR-Repertoires belegt eine oligoklonale Struktur mit Markierung der klonal expandierten, funktionell getesteten TCRs 1, 2 und 3. (C) FACS-basierte Analyse der Zytokinproduktion zeigt eine selektive IL-2- und IFN- γ -Antwort von TCR 2 und TCR 3 nach Stimulation mit KRASG12V, nicht jedoch mit dem KRASWT. (D) Die zytotoxische Aktivität beider TCRs führt zu einer dosisabhängigen Abtötung peptidbeladener BBLs, wobei bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (E:T) von 5:1 eine nahezu vollständige Elimination erreicht wurde. Unbeladene Zellen blieben unbeeinträchtigt. SI = Stimulation Index; berechnet als Verhältnis der Zytokin-positiven Zellen nach Peptidstimulation zur Hintergrundkontrolle (DMSO). C stellt diese Ergebnisse dar und verdeutlicht, dass TCR 3 eine stärkere Aktivierung als TCR 2 vermittelt. Zusätzlich wurde die zytotoxische Funktionalität der TCR-exprimierenden Jurkat-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402.

(A) Immunomonitoring zeigt eine persistierende CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen das KRASG12V-Peptid im Verlauf von 16 Impfungen (V1-V16). (B) Die Klonverteilung des TCR-Repertoires belegt eine oligoklonale Struktur mit Markierung der klonal expandierten, funktionell getesteten TCRs 1, 2 und 3. (C) FACS-basierte Analyse der Zytokinproduktion zeigt eine selektive IL-2- und IFN- γ -Antwort von TCR 2 und TCR 3 nach Stimulation mit KRASG12V, nicht jedoch mit dem KRASWT. (D) Die zytotoxische Aktivität beider TCRs führt zu einer dosisabhängigen Abtötung peptidbeladener BBLs, wobei bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (E:T) von 5:1 eine nahezu vollständige Elimination erreicht wurde. Unbeladene Zellen blieben unbeeinträchtigt. SI = Stimulation Index; berechnet als Verhältnis der Zytokinpositiven Zellen nach Peptidstimulation zur Hintergrundkontrolle (DMSO). D zeigt, führten beide TCRs zu einer dosisabhängigen Abtötung der aktivierten B-Zell-Blasten, wobei die KRAS^{G12V}-Peptid-beladenen Zellen bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (*effector to target ratio*, E:T) von 5:1 nahezu vollständig eliminiert wurden, während unbehandelte B-Zell-Blasten nicht betroffen waren.

Neben der funktionellen Analyse der TCRs wurde auch die klonale Verteilung der sequenzierten TCRs innerhalb der CD4⁺-T-Zell-Population von Patient ALL0402 untersucht. Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRASG12V-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402.

(A) Immunomonitoring zeigt eine persistierende CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen das KRASG12V-Peptid im Verlauf von 16 Impfungen (V1-V16). (B) Die Klonverteilung des TCR-Repertoires belegt eine oligoklonale Struktur mit Markierung der klonal expandierten, funktionell getesteten TCRs 1, 2 und 3. (C) FACS-basierte Analyse der Zytokinproduktion zeigt eine selektive IL-2- und IFN- γ -Antwort von TCR 2 und TCR 3 nach Stimulation mit KRASG12V, nicht jedoch mit dem KRASWT. (D) Die zytotoxische Aktivität beider TCRs führt zu einer dosisabhängigen Abtötung peptidbeladener BBLs, wobei bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (E:T) von 5:1 eine nahezu vollständige Elimination erreicht wurde. Unbeladene Zellen blieben unbeeinträchtigt. SI = Stimulation Index; berechnet als Verhältnis der Zytokinpositiven Zellen nach Peptidstimulation zur Hintergrundkontrolle (DMSO). B zeigt die Zusammensetzung der TCR-Repertoires mit einer ausgeprägten oligoklonalen Struktur, wobei TCR 1, TCR 2 und TCR 3 als repräsentative Klone markiert wurden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die funktionellen TCRs aus einer hochspezifischen klonalen Expansion hervorgingen.

Zusammenfassend zeigte die funktionelle Validierung der TCR-Kandidaten aus Patient ALL0402 eine starke Spezifität von TCR 2 und TCR 3 für KRAS^{G12V}, sowohl auf Ebene der Reporter-Signale als auch hinsichtlich der Zytokinproduktion und zytotoxischen Aktivität. Die durchgeführten Experimente liefern somit einen wichtigen Nachweis für die funktionelle Relevanz neoantigenspezifischer T-Zellen in der Immunantwort gegen mutierte KRAS-Varianten.

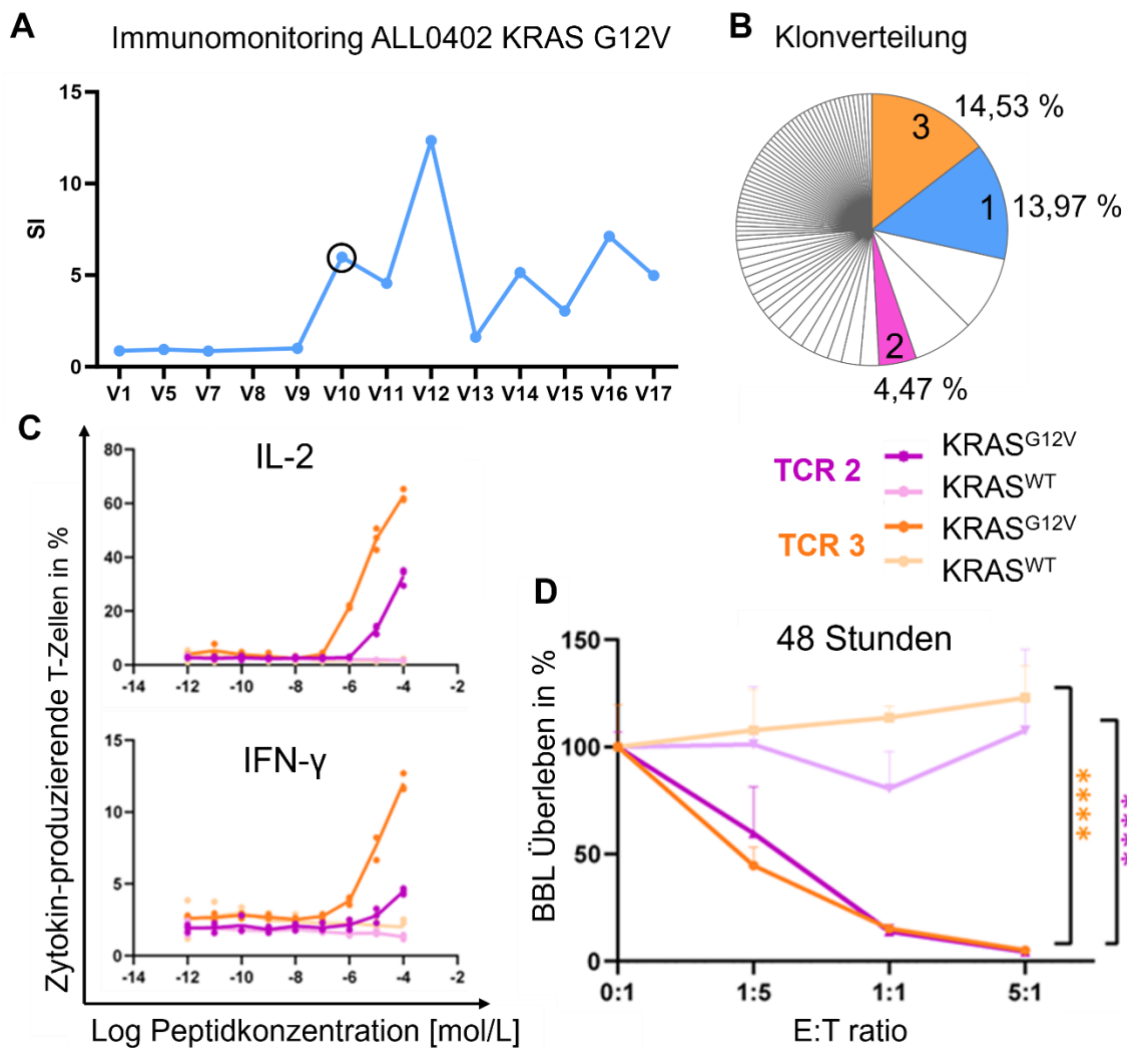


Abbildung 23 Funktionelle Charakterisierung KRAS^{G12V}-spezifischer TCRs aus Patient ALL0402. (A) Immunomonitoring zeigt eine persistierende CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen das KRAS^{G12V}-Peptid im Verlauf von 16 Impfungen (V1-V16). (B) Die Klonverteilung des TCR-Repertoires belegt eine oligoklonale Struktur mit Markierung der klonal expandierten, funktionell getesteten TCRs 1, 2 und 3. (C) FACS-basierte Analyse der Zytokinproduktion zeigt eine selektive IL-2- und IFN-γ-Antwort von TCR 2 und TCR 3 nach Stimulation mit KRAS^{G12V}, nicht jedoch mit dem KRAS^{WT}. (D) Die zytotoxische Aktivität beider TCRs führt zu einer dosisabhängigen Abtötung peptidbeladener BBLs, wobei bei einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis (E:T) von 5:1 eine nahezu vollständige Elimination erreicht wurde. Unbeladene Zellen blieben unbeeinträchtigt. SI = Stimulation Index; berechnet als Verhältnis der Zytokin-positiven Zellen nach Peptidstimulation zur Hintergrundkontrolle (DMSO).

3.3.1.2 Funktionelle Analyse weiterer TCR-Kandidaten der IVAC-ALL-1-Studie

Neben den KRAS^{G12V}-spezifischen TCRs aus Patient ALL0402 wurden weitere TCR-Kandidaten aus anderen Patienten funktionell charakterisiert. Die getesteten TCRs wurden aus CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen isoliert, mittels Einzelzellsequenzierung identifiziert und anschließend auf ihre Antigen-spezifität und funktionelle Aktivität überprüft. Tabelle 34 gibt einen Überblick über die funktionellen Testergebnisse dieser TCR-Kandidaten und zeigt sowohl peptidspezifische Reaktionen, als auch fehlende Antworten sowie Reaktivitäten gegenüber unbeladene B-Zell-Blasten.

Die funktionellen Analysen ergaben, dass die TCRs aus Patient ALL0101 (ZCCHC3/D269fs, CD4⁺) durch TCR 7 und TCR 8 eine spezifische Aktivierung nach Stimulation mit dem entsprechenden Impfpeptid aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den TCR-Kandidaten aus Patient ALL0105 (L3MBTL4/M188I, CD4⁺) ein heterogenes Reaktionsmuster: Während TCR 69 und TCR 19 eine Reaktivität gegenüber unbeladenen B-Zell-Blasten zeigten, waren TCR 17 und TCR 53 funktionell inaktiv. Diese Beobachtungen könnten auf eine potenzielle Kreuzreaktivität gegenüber Selbstantigenen oder auf die Erkennung geteilter Epitope hindeuten.

Ein vergleichbares Muster zeigte sich bei den TCR-Kandidaten aus Patient ALL0112, bei dem sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen untersucht wurden. Die meisten TCRs, darunter TCR 10, TCR 12, TCR 13, TCR 20 und TCR 21, wiesen keine spezifische Reaktivität auf. Allerdings reagierten TCR 15 und TCR 16, die gegen das Peptid EXOC4/R574P gerichtet waren, auf unbeladene B-Zell-Blasten, was auf eine potenzielle Erkennung geteilter Epitope hinweist.

Zusammenfassend zeigten mehrere TCR-Kandidaten eine spezifische Antigenreaktivität, wobei insbesondere die KRAS^{G12V}-spezifischen TCRs (TCR 2 und TCR 3) durch eine ausgeprägte funktionelle Aktivität gekennzeichnet waren. Gleichzeitig weisen die Reaktionen auf unbeladene B-Zell-Blasten darauf hin, dass bestimmte TCRs möglicherweise endogene B-Zell-assoziierte Antigene oder geteilte Epitope erkennen könnten, was im Rahmen der Diskussion weiter analysiert wird.

Tabelle 34 Funktionelle Charakterisierung von TCR-Kandidaten aus der IVAC-ALL-1-Studie.

Die Tabelle zeigt die funktionelle Charakterisierung verschiedener TCR-Kandidaten, die aus CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen verschiedener Patientinnen und Patienten isoliert wurden. Angegeben sind das erkannte Peptid beziehungsweise die Mutation, die jeweilige TCR-Bezeichnung sowie die beobachtete Reaktivität (peptidspezifisch, keine Reaktivität oder Reaktion gegenüber unbeladenen B-Zell-Blasten). In einzelnen Fällen wurde zusätzlich eine mögliche Kreuzreaktivität gegenüber geteilten Epitope dokumentiert.

Patient	Peptid/Mutation	TCR-Kandidaten	Funktionelle Aktivität
ALL0101	ZCCHC3/D269fs (CD4 ⁺)	TCR 7	Peptid-spezifisch
		TCR 8	Peptid-spezifisch
ALL0105	L3MBTL4/M188I (CD4 ⁺)	TCR 17	Keine spezifische Antwort
		TCR 19	Reaktivität gegen unbeladene B-Zell-Blasten
		TCR 53	Keine spezifische Antwort
		TCR 69	Reaktivität gegen unbeladene B-Zell-Blasten
ALL0105	FGL/T279A (CD8 ⁺)	TCR 2	Keine spezifische Antwort
ALL0107	ASAP3/A111V (CD4 ⁺)	TCR 18	Keine spezifische Antwort
ALL0112	CIC/A320S (CD8 ⁺)	TCR 10	Keine spezifische Antwort
		TCR 12	Keine spezifische Antwort
		TCR 20	Keine spezifische Antwort
		TCR 21	Keine spezifische Antwort
ALL0112	EXOC4/R574P (CD8 ⁺)	TCR 10	Keine spezifische Antwort
		TCR 12	Keine spezifische Antwort
		TCR 13	Keine spezifische Antwort
ALL0112	EXOC4/R574P (CD4 ⁺)	TCR 14	Keine spezifische Antwort
		TCR 15	Reaktivität gegen unbeladene B-Zell-Blasten (Reaktivität gegen geteiltes Epitop)
		TCR 16	Reaktivität gegen unbeladene B-Zell-Blasten (Reaktivität gegen geteiltes Epitop)
		TCR 19	Keine spezifische Antwort
ALL0402	KRAS/G12V (CD4 ⁺)	TCR 1	Keine spezifische Antwort
		TCR 2	Peptid-spezifisch
		TCR 3	Peptid-spezifisch

ALL0402	ABHD12/V240M (CD4 ⁺)	TCR 4	Peptid-spezifisch und auch schwache Aktivierung bei uneladenen B-Zell-Blasten
		TCR 6	Peptid-spezifisch und auch schwache Aktivierung bei uneladenen B-Zell-Blasten

3.4 Quantitative Analyse der HLA-Expression auf B-Zell-Blasten (QIFIKIT)

Die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf B-Zell-Blasten wurde mithilfe des QIFIKIT (Dako) quantifiziert. Hierzu wurden Proben aus einer repräsentativen Kohorte von 15 pädiatrischen Patientinnen und Patienten mit ALL analysiert. Die Detektion der HLA-Klasse-I-Expression erfolgte unter Verwendung des pan-HLA-Klasse-I-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32, während die HLA-Klasse-II-Expression mit dem HLA-DR, -DP, -DQ -spezifischen monoklonalen Antikörper Tü39 untersucht wurde. Beide Antikörper wurden in sättigender Konzentration eingesetzt, wobei parallel isotypische Kontrollen zum Nachweis der spezifischen Antikörperbindung eingesetzt wurden.

Die quantitative Durchflusszytometrie zeigte eine hohe Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf den B-Zell-Blasten, wobei die Anzahl der Moleküle pro Zelle eine breite Streuung aufwies (Median: 121.183 Moleküle/Zelle, Intervall: 17.286–292.795 Moleküle/Zelle). Die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen war im Vergleich dazu ebenfalls variabel, jedoch im Median niedriger (Median: 53.986 Moleküle/Zelle, Intervall: 13.608–271.042 Moleküle/Zelle).

Die in Abbildung 24 Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf B-Zell-Blasten.

Die Quantifizierung erfolgte mittels QIFIKIT in einer repräsentativen Kohorte von 15 pädiatrischen Patientinnen und Patienten mit ALL. Die Molekülanzahl pro Zelle wurde durchflusszytometrisch bestimmt und auf logarithmischer Skala dargestellt. dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Unterschiede in der Antigendichte zwischen HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf B-Zell-Blasten. Während die Mehrheit der Proben eine höhere Expression von HLA-Klasse-I aufwies, zeigten einige Proben eine auffällig niedrige Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen. Diese Unterschiede könnten unterschiedliche Reifungsstadien der B-Zell-Blasten oder patientenspezifische Variationen des Immunstatus widerspiegeln.

Zusammenfassend bestätigt die quantitative Analyse mittels QIFIKIT die heterogene HLA-Expression auf B-Zell-Blasten bei Patientinnen und Patienten mit ALL. Diese Erkenntnisse tragen zur immunologischen Charakterisierung bei und könnten potenzielle therapeutische Implikationen haben.

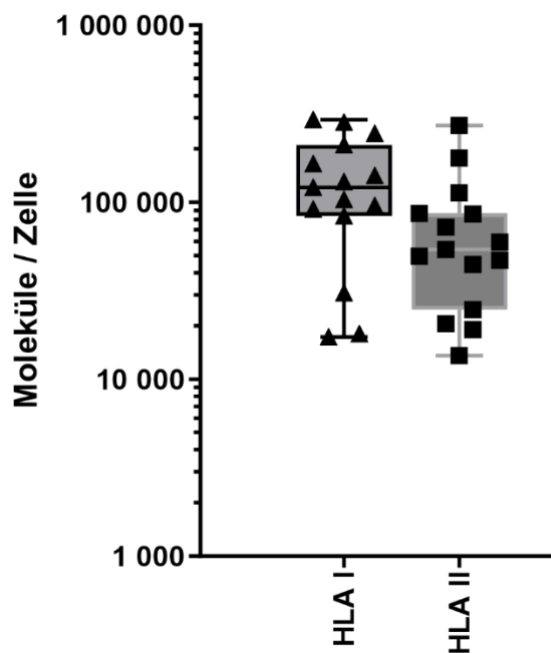


Abbildung 24 Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen auf B-Zell-Blasten.

Die Quantifizierung erfolgte mittels QIFIKIT in einer repräsentativen Kohorte von 15 pädiatrischen Patientinnen und Patienten mit ALL. Die Molekülanzahl pro Zelle wurde durchflusszytometrisch bestimmt und auf logarithmischer Skala dargestellt.

3.5 *In vitro* Challenge mit autologen Blasten zur Aktivierung impfspezifischer T-Zellen

Zur Evaluierung der Effektivität der Impfstrategie wurden impfstoffspezifische T-Zellklone in Kombination mit autologen ALL-Blasten untersucht. Am Versuchstag erfolgte zunächst die Bestimmung der Zellzahl der expandierten T-Zellklone, sodass pro Experiment fünf parallele Versuchsansätze durchgeführt werden konnten. Gleichzeitig wurden die ALL-Blasten aufgetaut, gezählt und in zwei gleich große Aliquots aufgeteilt. Eine Hälfte der Blasten wurde für 3–4 Stunden mit dem

Impfpeptid beladen, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Die hier analysierten T Zellklone stammen aus einem individuellen Heilversuch, bei dem ein Patient analog zum IVAC-ALL-1-Protokoll mit einer personalisierten peptidbasierten Vakzine behandelt worden war. Das verwendete Impfpeptid hatte im Immunomonitoring eine CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort ausgelöst. Insgesamt wurden 17 impfstoffspezifische T Zellklone getestet, jeweils unter fünf verschiedenen Stimulationsbedingungen.

Die T-Zellen wurden anschließend unter fünf verschiedenen Bedingungen kultiviert: mit beladenen Blasten (T + BL), mit beladenen Blasten in Anwesenheit eines blockierenden Antikörpers (T + BL + B-AK), mit unbeladenen Blasten (T + UBL), mit unbeladenen Blasten plus blockierendem Antikörper (T + UBL + B-AK) sowie als Positivkontrolle mit Peptid ohne APCs (T + Pep). Nach einer 24-stündigen Kokultivierung wurde die T-Zell-Aktivierung mittels FACS-basierter *Intracellular Cytokine Staining* (ICS) analysiert. Dabei wurde die Multi-Zytokinantwort durch simultane Detektion von IFN γ , TNF α , CD154 und IL-2 bestimmt. Zur quantitativen Auswertung wurde ein Stimulationsindex (ASI-MCR) berechnet, der die kombinierte Aktivierung der T-Zellen in Relation zu einer Hintergrundkontrolle wiedergibt.

Die Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen, die mit beladenen Blasten kultiviert wurden, einen signifikant höheren ASI-MCR aufwiesen als jene, die mit unbeladenen Blasten inkubiert wurden. Dies bestätigt, dass die Peptidbeladung der Blasten die spezifische T-Zell-Aktivierung verstärkt. Zudem führte die Blockade durch spezifische Antikörper in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion des ASI-MCR, wobei eine Restaktivität bestehen blieb, was möglicherweise auf eine unvollständige Blockade oder eine partielle Antigenunabhängigkeit der TCR-Stimulation hinweist.

Die statistische Analyse ergab, dass der ASI-MCR in der Bedingung T + BL signifikant höher war als in der Bedingung T + BL + B-AK ($p < 0,01$), was die antigenspezifische T-Zell-Aktivierung bestätigt (Abbildung 25 A). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für die Bedingung T + UBL versus T + UBL + B-AK beobachtet, allerdings war die Differenz weniger ausgeprägt ($p < 0,05$, Abbildung 25 B). Der direkte Vergleich zwischen beladenen und unbeladenen Blasten zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung des ASI-MCR durch die Peptidbeladung ($p < 0,05$, Abbildung 25 C). Schließlich konnte demonstriert werden, dass die Antikörperblockade in der Bedingung T + UBL + B-AK eine deutliche Reduktion der Zytokinantwort bewirkte, die sich hochsignifikant von der Peptid-Kontrolle (T + Pep) unterschieden ($p < 0,0001$, Abbildung 25 D).

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass die gezielte Beladung von ALL-Blasten mit Impfpeptiden eine signifikante Verstärkung der T-Zell-Aktivierung bewirkt. Die beobachteten Reduktionen des ASI-MCR nach Antikörperblockade belegen zudem die Antigen-spezifität der TCR-vermittelten Aktivierung, während die verbliebene Restaktivität darauf hindeuten könnte, dass zusätzliche Signale oder unspezifische Mechanismen zur T-Zell-Stimulation beteiligt sind. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der Peptidbeladung für die Immunantwort und liefern weitere Hinweise auf die funktionelle Relevanz der untersuchten TCR-Kandidaten.

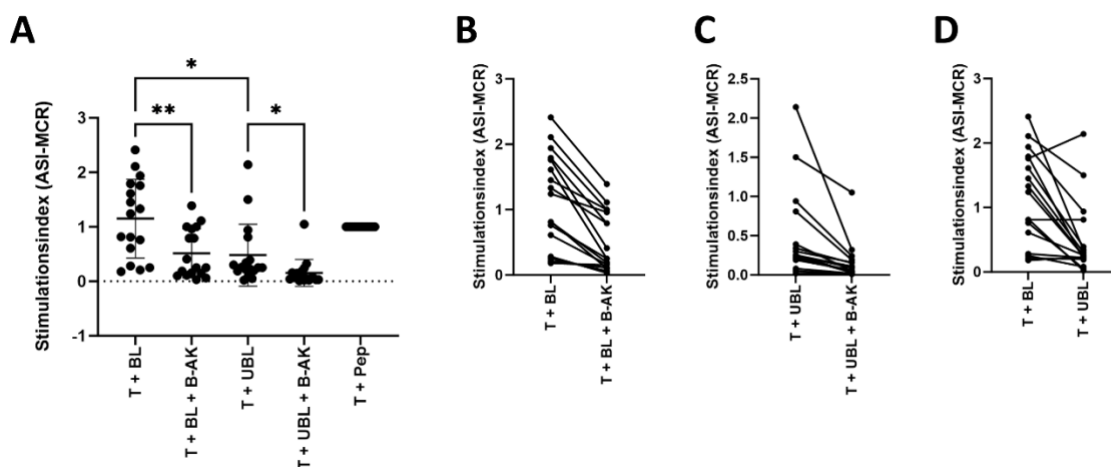


Abbildung 25 Stimmulationsindex der Multi-Zytokinantworten (ASI-MCR) unter verschiedenen Bedingungen der *Blasten-Challenge*.

Die Darstellung zeigt die funktionelle Aktivierung impfspezifischer T-Zellen, gemessen anhand des kombinierten Stimmulationsindex (ASI-MCR) aus IFN γ , TNF α , CD154 und IL-2. Die Werte wurden an die Bedingung „T + Pep“ (T-Zellen + Peptid ohne APCs) normiert (Wert = 1). Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant).

(A) Vergleich der Bedingungen: „T + BL“, „T + BL + B-AK“, „T + UBL“, „T + UBL + B-AK“ sowie „T + Pep“ (Peptid-Kontrolle). Die Bedingung „T + BL“ zeigte eine signifikant höhere Aktivierung als „T + BL + B-AK“ ($p < 0,01$), was auf die Antigen-spezifität der T-Zell-Antwort hinweist.

(B) Die Blockade in der Bedingung „T + BL + B-AK“ führte zu einer signifikanten Reduktion des ASI-MCR im Vergleich zu „T + BL“ ($p < 0,01$).

(C) Der Vergleich „T + BL“ und „T + UBL“ zeigte eine signifikante Erhöhung des ASI-MCR bei Peptidbeladung ($p < 0,05$).

(D) In der Bedingung „T + UBL + B-AK“ war die Zytokinantwort deutlich niedriger als in der Peptidkontrolle („T + Pep“); der Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Abkürzungen: T = T-Zellen, BL = beladene Blasten, UBL = unbeladene Blasten, B-AK = blockierender Antikörper, Pep = Peptid.

3.6 Immunomonitoring der IVAC-RCC-001-Vakzinierungsstudie

Im Rahmen der IVAC-RCC-001-Studie wurde die Immunantwort auf einen patientenspezifischen Peptid-Impfstoff untersucht. Ziel war die Entwicklung eines individualisierten Impfstoffs auf Basis gezielter Peptidselektion zur Induktion einer robusten T-Zell-Antwort.

3.6.1 Peptidselektion und Impfstoffzusammensetzung

Die Auswahl der Peptide für den Impfstoff basierte auf einer Rangliste von Peptidsequenzen, die mittels der bioinformatischen Tools SYFPEITHI, netMHC und netMHCpan erstellt wurde. Ziel war es, aus der Liste der priorisierten Peptide drei Kandidaten auszuwählen, die unter GMP-Bedingungen im Wirkstoffpeptidlabor Tübingen hergestellt werden konnten. Diese Peptide sollten zusammen mit zwei bereits feststehenden Kontrollpeptiden einen Impfstoff aus insgesamt fünf Peptiden bilden.

Dazu wurde zunächst Tumorgewebe des Patienten sequenziert und mit gesundem Referenzmaterial (Fibroblasten) verglichen. Diese Analyse ermöglichte die Identifizierung mutierter und tumorspezifischer Antigene, welche die Grundlage für die Peptidvorhersage bildeten. Die bioinformatische Analyse zur Bewertung der HLA-Bindungsaffinität erfolgte durch den Einsatz der Algorithmen netMHC, netMHCpan und SYFPEITHI. Ein Peptid wurde als Binder eingestuft, wenn es in allen drei Programmen als hochaffin bewertet wurde. Neben der Bindungsaffinität wurden auch die Mutationshäufigkeit sowie die Expression im Tumorgewebe berücksichtigt. Die vorhergesagten Peptide wurden anschließend hinsichtlich ihrer Affinität, ihrer Produktionseignung unter GMP-Bedingungen und ihrer Tumorspezifität priorisiert (siehe Material und Methoden 2.4.6). Die endgültige Zusammensetzung des Impfstoffs ist in Tabelle 35 dargestellt.

Ergänzend zu den individuell ausgewählten mutierten Peptiden wurden zwei Kontrollpeptide in den Impfstoff integriert: Das BRIC5 (Survivin) Peptid repräsentiert ein tumorassoziiertes Selbstantigen mit bekannter Immunogenität, während das CA9-Peptid aus einem früheren Vakzinierungs-Projekt übernommen wurde, in dem es als immunologisch relevantes Epitop identifiziert worden war. Beide Kontrollpeptide dienen der funktionellen Einordnung der Immunantwort und ermöglichen eine vergleichende Bewertung neoantigenspezifischer versus tumorselbstantigenspezifischer T-Zellreaktionen.

Tabelle 35 Peptid-Impf-Cocktail für Patient IVAC-RCC-001

Priorität	Sequenz	Gen und Variante	HLA
1	SRVSIKDHL	PHOCN:NM_001256: p.E150Dfs*4	C*0702
2	GTGTPVGPETKTLPS	N276:NM_001256: p.A297P	KI. II
3	KTPEVGPVPPGPLS	KDM6B:NM_001082: p.G643V	KI. II
2	EIHVVHLSTAFARVDEALGR	250/CA9	KI. II
1	TLGEFLKLDREKAKN	BRIC5 (Survivin)	KI. II

Bei der PeptidAuswahl wurde darauf geachtet, sowohl HLA-Klasse-I- als auch HLA-Klasse-II-restringierte Epitope in den Cocktail zu integrieren, um eine möglichst breite T-Zell-Antwort zu induzieren. Im weiteren Verlauf wurde die Immunantwort mittels Immunomonitoring analysiert, um die Reaktivität der spezifischen T-Zellen gegenüber dem Impfcoktail zu untersuchen.

3.6.2 Gating-Strategie und Immunomonitoring

Zur Beurteilung der Reaktivität spezifischer T-Zellen gegenüber dem Impfcoktail wurde eine mehrstufige *Gating*-Strategie angewendet. Die FACS-Analyse ermöglichte die Unterscheidung zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen als auch die Identifikation aktivierter Zellen durch die Detektion von IFN γ , TNF α , IL-2 und CD154.

In Abbildung 26 Exemplarische FACS-Plots zur *Gating*-Strategie im Immunomonitoring.

Darstellung der Koexpression von IFN γ und TNF α in aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit PMA (positive Kontrolle), DMSO (Negativkontrolle) oder Peptid (von links nach rechts). Ganz rechts: Überlagerung der DMSO- und Peptid-Bedingung zur Visualisierung der differenziellen Aktivierung. ist die *Gating*-Strategie exemplarisch dargestellt. Zunächst erfolgte die Identifikation von Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität (*FSC/SSC-Gating*). Anschließend erfolgte das *Gating* auf lebende Zellen, gefolgt von der Selektion der CD4⁺- beziehungsweise CD8⁺-T-Zell-Populationen. Die Aktivierung der Zellen wurde schließlich anhand der Koexpression von IFN γ und TNF α überprüft; IL-2 und CD154 wurden ebenfalls analysiert, sind jedoch in der Abbildung nicht dargestellt. Verglichen wurden sowohl DMSO- als auch peptidstimulierte Bedingungen. Die dargestellten FACS-Plots zeigen exemplarisch, dass in der peptidstimulierten

Bedingung eine verstärkte Zytokinproduktion nachweisbar ist, während in der DMSO-Kontrolle nur geringe bis keine Aktivierung erkennbar ist.

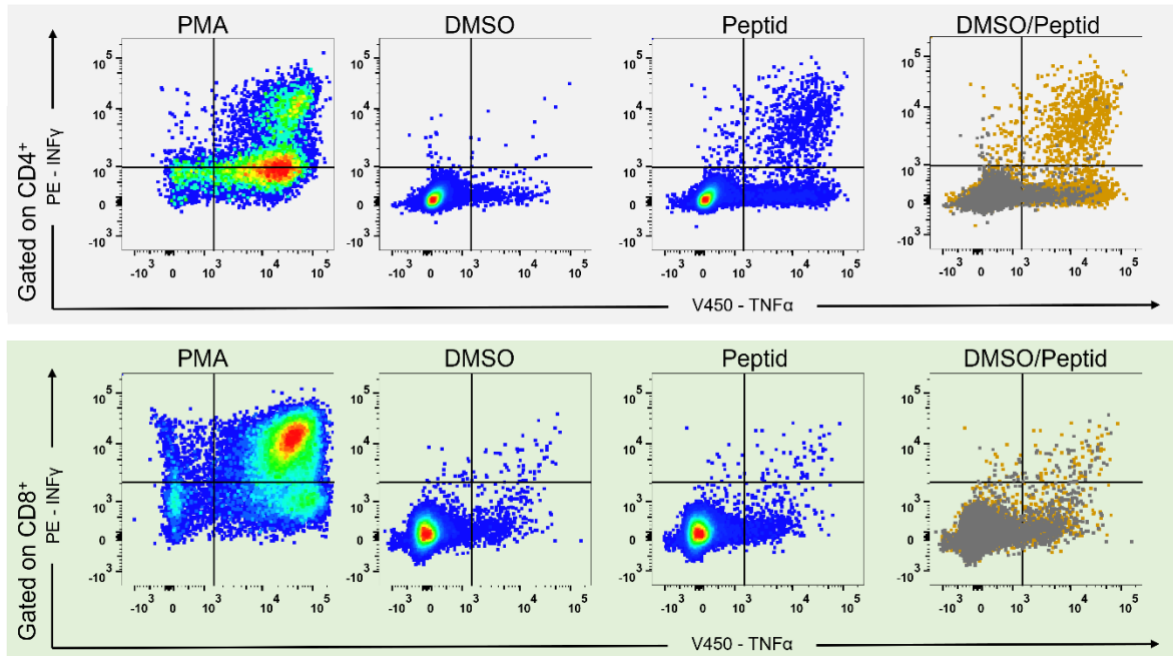


Abbildung 26 Exemplarische FACS-Plots zur *Gating*-Strategie im Immunomonitoring.

Darstellung der Koexpression von IFN γ und TNF α in aktivierten CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -T-Zellen nach Stimulation mit PMA (positive Kontrolle), DMSO (Negativkontrolle) oder Peptid (von links nach rechts). Ganz rechts: Überlagerung der DMSO- und Peptid-Bedingung zur Visualisierung der differenziellen Aktivierung.

Die im Folgenden analysierten Peptide P1 bis P5 entsprechen den drei individuell ausgewählten Neoantigen-Kandidaten des für den Patienten formulierten Impfstoffs sowie den zwei ergänzenden Kontrollpeptiden (Tabelle 35). Der Patient erhielt insgesamt 16 Impfungen im Rahmen eines personalisierten Impfschemas, das drei initiale Dosen an den Tagen 1-3 umfasste, gefolgt von vier wöchentlichen und anschließenden vierwöchentlichen Impfungen. Die letzte Dosis wurde an Tag 225 verabreicht. Die Visitenbezeichnungen (V1–V16) beziehen sich jeweils auf definierte Zeitpunkte im Verlauf der Impfserie, wobei V1 der Ausgangszeitpunkt vor der ersten Impfung darstellt. Abbildung 27 FACS-basierte Analyse der T-Zell-Reaktivität auf die Peptidvakzinierung (V15).

Die dargestellten FACS-Plots zeigen die Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α in CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -T-Zellen nach Stimulation mit den Peptiden P1 bis P5 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Für jedes Peptid wird die Reaktivität getrennt nach T-Zell-Subtypen und Stimulierung dargestellt.

Rechtsseitig erfolgt jeweils die Gegenüberstellung der DMSO- und Peptid-Bedingung zur Visualisierung der spezifischen Aktivierung. Die zugehörigen Liniengraphen zeigen den Stimulationsindex (SI) für die kombinierte Zytokinantwort über den gesamten Beobachtungszeitraum; einzelne Zeitpunkte wie V10 und V15 sind zur Orientierung markiert. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert $SI = 1$ (kein Unterschied zwischen Stimulus und Kontrolle), während die durchgezogene Linie bei $SI = 2$ liegt und eine relevante spezifische Reaktivität anzeigt. zeigt die Ergebnisse des Immunomonitorings eines Patienten zum Zeitpunkt V15. Die FACS-Plots visualisieren die Zytokinproduktion ($IFN\gamma$ und $TNF\alpha$) in $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen nach Stimulation mit den Peptiden P1 bis P5 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Überlagerung der Plots ermöglicht eine differenzierte Beurteilung der peptidspezifischen T-Zell-Reaktivität.

Zusätzlich veranschaulichen die Liniengraphen den Stimulationsindex (SI) der kombinierten Zytokinantworten im Verlauf der Studie. Dabei wird deutlich, dass einzelne Peptide eine deutlich stärkere Immunantwort hervorrufen als andere – ein Hinweis auf Unterschiede in der Immunogenität.

Diese Ergebnisse belegen, dass die verwendeten Peptide eine gezielte Aktivierung impfspezifischer T-Zellen induzieren können. Die Analyse der Zytokinexpression erlaubt darüber hinaus eine funktionelle Unterscheidung zwischen stark und schwach immunogenen Peptiden – ein Aspekt, der für die zukünftige Optimierung personalisierter Impfstrategien von zentraler Bedeutung ist.

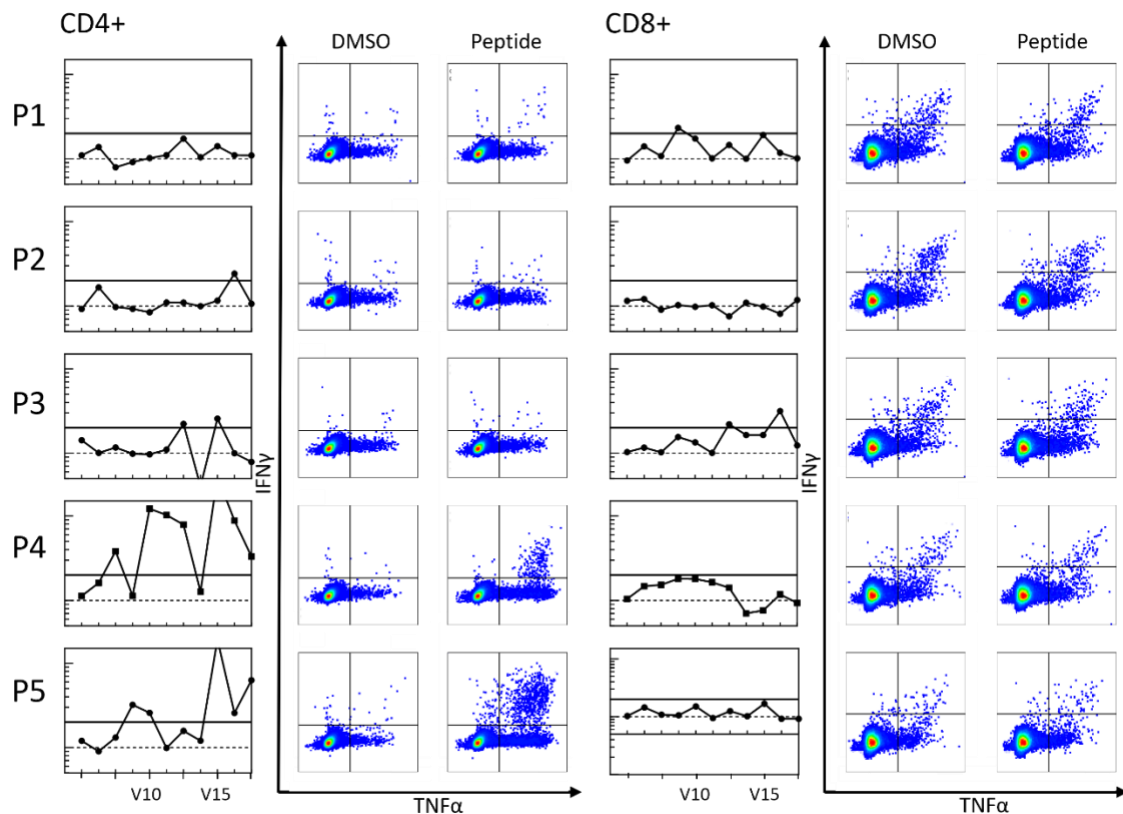


Abbildung 27 FACS-basierte Analyse der T-Zell-Reaktivität auf die Peptidvakzinierung (V15).

Die dargestellten FACS-Plots zeigen die Produktion der Zytokine IFN γ und TNF α in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit den Peptiden P1 bis P5 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Für jedes Peptid wird die Reaktivität getrennt nach T-Zell-Subtypen und Stimulierung dargestellt. Rechtsseitig erfolgt jeweils die Gegenüberstellung der DMSO- und Peptid-Bedingung zur Visualisierung der spezifischen Aktivierung. Die zugehörigen Liniengraphen zeigen den Stimulationsindex (SI) für die kombinierte Zytokinantwort über den gesamten Beobachtungszeitraum; einzelne Zeitpunkte wie V10 und V15 sind zur Orientierung markiert. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert SI=1 (kein Unterschied zwischen Stimulus und Kontrolle), während die durchgezogene Linie bei SI=2 liegt und eine relevante spezifische Reaktivität anzeigt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die klonale Zusammensetzung sowie die funktionelle Reaktivität von TCRs untersucht, die nach einer Peptidvakzinierung gegen tumorassoziierte Neoantigene selektiert worden waren. Durch die Kombination aus Einzelzellsortierung, TCR-Sequenzierung und orthotopem TCR-Austausch konnten spezifische TCRs identifiziert und in einem standardisierten reporterbasierten Testsystem funktionell analysiert werden.

Die hier präsentierten Ergebnisse bieten sowohl grundlagenwissenschaftlich relevante Einblicke in die immunologische Antwort auf personalisierte Peptidvakzine als auch translationale Erkenntnisse für die Weiterentwicklung TCR-basierter Immuntherapien.

Ein zentrales Ziel bestand darin, TCRs mit Spezifität für neoantigenkodierende Peptide zu identifizieren, die durch die Vakzinierung in Patientinnen und Patienten selektiv expandiert worden waren. Die klonale Analyse des TCR-Repertoires zeigte insbesondere im Fall von KRAS^{G12V} eine ausgeprägte oligoklonale Expansion spezifischer CD4⁺-TCRs – ein Hinweis auf eine effektive Immunantwort gegen dieses mutierte Onkoprotein. Die Ergebnisse unterstreichen die Relevanz individualisierter Impfstrategien zur gezielten Induktion funktioneller, potenziell tumorspezifischer T-Zell-Klone.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der methodischen Etablierung des OTR-Systems in Tübingen. Während die funktionellen Validierungen ausgewählter TCRs aus der IVAC-ALL-1-Studie in Zusammenarbeit mit München erfolgten, konnte in Tübingen die technische Implementierung dieser CRISPR-Cas9-basierten Methode erfolgreich etabliert werden. Damit wurde eine Grundlage geschaffen, um spezifische TCRs unabhängig vom begrenzten Patientenmaterial systematisch zu analysieren und für die Weiterentwicklung personalisierter TCR-basierter Therapien nutzbar zu machen.

Darüber hinaus lieferte die Auswahl und funktionelle Analyse der Vakzinierungspeptide wertvolle Erkenntnisse für die Optimierung zukünftiger Impfstoffzusammensetzungen. Während in der IVAC-RCC-Studie aufgrund der limitierten Patientenzahl keine vertieften Analysen möglich war, bieten die Ergebnisse aus IVAC-ALL-1 und ihrer Analyse (IVAC-AN) eine wertvolle retrospektive Grundlage zur Bewertung der Peptidwahl. Die Beobachtung starker, oligoklonaler und funktionell aktiver T-Zell-Antworten auf bestimmte Peptide – wie im Fall von KRAS^{G12V} – kann in zukünftigen Studien genutzt werden, um *in silico*

Priorisierungsalgorithmen weiter zu verfeinern, beispielsweise durch die stärkere Gewichtung molekularer Merkmale, die mit immunogener Reaktivität assoziiert sind.

Ein nicht unerheblicher Aspekt betrifft die beobachtete Reaktivität einzelner TCRs gegenüber unbeladenen autologe B-Zell-Blasten. Diese unerwarteten Reaktionen deuten auf potenzielle Kreuzreaktivitäten hin – entweder im Sinne der Erkennung geteilter Epitope oder endogener B-Zell-assoziiertes Antigene. Derartige Befunde sind im Hinblick auf die klinische Sicherheit von TCR-basierten Therapien von zentraler Bedeutung und machen eine detaillierte funktionelle und bioinformatische Validierung erforderlich.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass durch Peptidvakzinierung TCRs mit hoher Antigen-spezifität generiert und funktionell validiert werden können. Gleichzeitig wird die Notwendigkeit umfassender Sicherheitsprüfungen zur Identifikation potenzieller *Off-Target*-Effekte deutlich. Die vorgestellten Methoden und Erkenntnisse leisten damit wesentlich zur Weiterentwicklung präziser, personalisierter TCR-Therapien bei und bilden eine wissenschaftlich fundierte Grundlage für deren zukünftige klinische Anwendung

4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse

Die klonale Zusammensetzung und funktionelle Reaktivität von T-Zell-Rezeptoren, die nach Peptidvakzinierung gegen tumorassoziierte Neoantigene selektiert wurden, wurde in dieser Arbeit umfassend untersucht. Auf Basis einer Kombination aus Einzelzellsortierung, TCR-Sequenzierung und OTR konnten ausgewählte TCRs funktionell überprüft werden. Die Ergebnisse zeigen, dass personalisierte Peptidvakzinierung die Expansion spezifischer T-Zell-Klone induzieren kann, die nach *ex vivo* Stimulation eine selektive, antigenspezifische Immunantwort vermitteln.

Die Analyse des TCR-Repertoires offenbarte eine heterogene klonale Zusammensetzung mit interindividuell variierenden Expansionsmustern. Während in einigen Fällen eine dominante oligoklonale Expansion einzelner Klone beobachtet wurde, zeigten andere Proben polyklonale Reaktionen. Besonders auffällig war die selektive Expansion KRASG^{12V}-reaktiver CD4⁺-TCRs bei Patient ALL0402, was auf eine durch die Vakzinierung induzierte Immunantwort gegen dieses mutierte Onkoprotein hinweist. Die funktionelle Validierung erfolgte in einem

reporterbasierten OTR-System in Jurkat-TPR-Zellen. Hierbei zeigten TCR 2 und TCR 3 aus Patient ALL0402 eine ausgeprägte Peptidreaktivität nach Stimulation mit KRAS^{G12V}-beladenen B-Zell-Blasten, wohingegen andere TCRs nur eine geringe oder keine Aktivität aufwiesen. HLA-Restriktionsexperimente belegten, dass TCR 2 über HLA-DR1 und TCR 3 über HLA-DQ2 präsentiert wurde, was auf eine spezifische MHC-Klasse-II-Bindung hinweist.

Ergänzend wurden *Blasten-Challenge*-Experimente mit impfstoffreaktiven T-Zellen aus einem individuellen Heilversuch durchgeführt. Ziel war es, die Vakzinierungs-induzierte Reaktivität unabhängig vom OTR-System zusätzlich zu bestätigen. Nach *ex vivo* Stimulation mit peptidbeladenen autologen B-Zell-Blasten konnte eine robuste Zytokinfreisetzung detektiert werden, die durch HLA-Blockade signifikant gehemmt wurde. Diese Befunde bestätigen die Funktionalität der *in vivo* expandierten T-Zellen und belegen die antigenspezifische Aktivierung.

Ein weiteres Ziel war die Etablierung des OTR-Systems in Tübingen. Während die funktionellen Validierungen der IVAC-ALL-1-TCRs in München erfolgte, wurde die CRISPR-Cas9-vermittelte Integration neoantigenspezifischer TCRs erfolgreich in Tübingen etabliert - einschließlich Genomeditierung, die Tyto-basierte Selektion transgener Zellen und anschließender funktionelle Charakterisierung.

Zur besseren Einordnung der funktionellen Daten wurde die Expression von HLA-Klasse-I- und -II-Molekülen auf autologen B-Zell-Blasten mittels QIFIKIT bestimmt. Es zeigte sich eine interindividuell stark variierende HLA-Klasse-II-Expression, was Unterschiede in der Antigenpräsentation erklären und die Interpretation funktioneller Testergebnisse beeinflussen kann. Diese Beobachtung hat direkte Relevanz für zukünftige Peptidvakzinierungsstrategien.

Für die funktionellen Assays kamen etablierte Tumorzelllinien (MCF-7, Nalm6) zum Einsatz, die relevante HLA-Allele exprimieren und sich in der Laborroutine bewährt haben. Ihre Auswahl basierte auf einer Kombination aus Verfügbarkeit, Reproduzierbarkeit und dokumentierter Antigenpräsentation. Für bestimmte Fragestellungen – etwa zur detaillierten Analyse von Klasse-II-restringierten TCRs – könnte zukünftig der ergänzende Einsatz von antigenpräsentierenden Zellen mit gezielt definierter MHC-Klasse-II-Expression sinnvoll sein, um funktionelle Charakterisierungen noch differenzierter vornehmen zu können.

Darüber hinaus wurde die potenzielle Kreuzreaktivität einzelner TCRs überprüft. Einige zeigten eine Reaktivität gegenüber unbeladenen B-Zell-Blasten, was auf die Erkennung geteilter Epitope oder endogener, B-Zell-assoziiierter Antigene hindeuten könnte. Solche Befunde sind von sicherheitsrelevanter Bedeutung und

unterstreichen die Notwendigkeit präklinischer Testsysteme zur frühzeitigen Identifikation möglicher *Off-Target*-Effekte.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse das Potenzial personalisierter Peptidvakzinierung zur Induktion neoantigenspezifischer T-Zell-Antworten. Die funktionelle *in vitro* Validierung liefert zugleich wichtige Hinweise zur Spezifität, MHC-Restriktion und potenziellen Kreuzreaktivität einzelner TCRs. Diese Erkenntnisse bilden eine wesentliche Grundlage für die präklinische Weiterentwicklung sicherer und selektiver TCR-basierter Immuntherapien. Zur Validierung und Weiterentwicklung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch weiterführende funktionelle Analysen einer größeren Anzahl impfstoffinduzierter T-Zellen erforderlich.

4.2 Einordnung in den Kontext bestehender Studien zur TCR-basierter Immuntherapie

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stehen in direktem Zusammenhang mit einer wachsenden Zahl translationaler Studien, die das immunologische Potenzial personalisierter Peptidvakzinierungen zur Induktion neoantigenspezifischer T-Zell-Antworten untersuchen. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass solche Vakzinierungsstrategien klonale T-Zell-Antworten gegen Neoantigene hervorrufen können, die zu einer nachhaltigen Immunüberwachung beitragen [182, 183].

Insbesondere bei malignen Melanomen, aber auch bei Tumorentitäten mit geringerer Immunogenität wie dem Glioblastom, konnten durch personalisierte Neoantigen-Vakzine sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-vermittelte Immunantworten ausgelöst werden. So demonstrierten Keskin *et al.* in einer Phase-I-Studie, dass patientenspezifische Peptide intratumorale T-Zell-Antworten induzieren können – ein Befund, der die prinzipielle Übertragbarkeit dieses Ansatzes auch auf immunologisch schwer zugängliche Tumore bestätigt [21].

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung personalisierter Vakzinierungsstrategien bietet die klinische Studie von Sahin *et al.*, in der bei Patientinnen und Patienten mit malignem Melanom patientenspezifisch kodierte mRNA-Sequenzen eingesetzt wurden. Die zugrunde liegende Technologie der mRNA-Vakzinierung wurde bereits in den 1990er Jahren, unter anderem durch Arbeiten in Tübingen, entwickelt und später für therapeutische Anwendungen optimiert [184, 185]. In der Phase-I-Studie

konnten durch individualisierte RNA-Vakzine robuste CD4⁺- und CD8⁺-vermittelte Immunantworten induziert werden, die mit einer reduzierten Tumorlast und einem verlängerten rezidivfreien Überleben assoziiert waren – ein Befund, der die Übertragbarkeit etablierter mRNA-Plattformen auf die personalisierte Tumorimmuntherapie belegt [20].

Die in dieser Arbeit analysierten neoantigenspezifischen TCRs stammen aus der IVAC-ALL-1-Studie, die eine personalisierte Peptidvakzinierung bei Patientinnen und Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie zum Ziel hatte. Besonders hervorzuheben ist die selektive Expansion von CD4⁺-TCRs mit Spezifität für KRAS^{G12V} bei Patient ALL0402 – ein Befund, der mit früheren Beobachtungen zur Immunogenität tumorspezifischer Neoantigene konsistent ist [186, 187] und darauf hindeutet, dass dieses Peptid auch für andere Patientinnen und Patienten mit entsprechender KRAS-Mutation und HLA-Kompatibilität ein vielversprechender Zielantigenkandidat sein könnte..

Zur funktionellen Charakterisierung kam das orthotope TCR-Replacement-System in Jurkat-TPR-Zellen zum Einsatz, das eine gezielte Analyse der TCR-vermittelten Signaltransduktion erlaubt. Im Gegensatz zu klassischen Methoden wie Tetramer-Staining oder ELISpot erlaubt das OTR-System die präzise Untersuchung intrazellulärer Signalwege. Frühere Arbeiten haben belegen, dass die simultane Aktivierung von NF-κB, NFAT und AP-1 eine zentrale Rolle für die Effektivität T-Zell-vermittelter Immunität spielt [188] – ein Konzept, das durch die hier präsentierten OTR-Daten funktionell Unterstützung findet [189].

Die funktionelle Validierung der KRAS^{G12V}-reaktiven TCRs aus Patient ALL0402 verdeutlicht, dass durch Peptidvakzinierung eine oligoklonale, tumorspezifische CD4⁺-T-Zell-Antwort induziert werden kann. Während sich frühere Studien vorrangig auf CD8⁺-TCRs konzentrierten – insbesondere im Hinblick auf deren zytotoxisches Potenzial [190] – zeigen aktuelle Arbeiten und die hier vorgestellten Daten, dass auch CD4⁺-T-Zellen eine substantielle antitumorale Wirkung entfalten können und somit eine wichtige Rolle in TCR-basierten Therapieansätzen einnehmen.

Ein weiterer relevanter Aspekt ist die Beobachtung potenzieller Kreuzreaktivität einzelner TCRs. In dieser Arbeit zeigten einige TCR-Kandidaten unerwartete Reaktivität gegenüber unbeladenen autologen B-Zell-Blasten, was auf die Erkennung geteilter Epitope oder endogener, B-Zell-assoziiertes Antigene hindeuten könnte. Solche *Off-Target*-Effekte sind auch aus klinischen Studien bekannt und stellen ein wesentliches Sicherheitsrisiko dar. Die Anti-MAGE-A3-TCR-Studie dokumentierte schwerwiegende Nebenwirkungen

durch unerwünschte TCR-Kreuzreaktivität [191], was die Notwendigkeit umfassender präklinischer Sicherheitsanalysen unterstreicht [192].

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Blasten-Challenge*-Experimente ergänzen diese Beobachtungen durch funktionelle Daten zur Antigenpräsentation. Dabei zeigten peptidbeladene autologe B-Zell-Blasten eine signifikant stärkere T-Zell-Aktivierung, während unbehandelte Blasten nur eine basale Reaktion hervorriefen. Diese Befunde bestätigen die Bedeutung professioneller antigenpräsentierender Zellen für die Wirksamkeit peptidbasierter Vakzine und verdeutlichen, dass HLA-Restriktion und Antigenpräsentationskapazität zentrale Einflussfaktoren der Immunantwort darstellen [191, 193].

Ein abschließender Vergleich mit der IVAC-RCC-001-Studie zeigt, dass trotz methodischer Parallelen – insbesondere bei der Peptidwahl und Immunomonitoring – die dort stark limitierte Patientenzahl keine belastbaren Schlussfolgerungen zuließ. Im Gegensatz dazu ermöglichen die aus der IVAC-ALL-1-Studie gewonnenen Daten eine gezielte Rückkopplung zur Peptidpriorisierung und könnten dazu beitragen, künftig bevorzugt solche Neoantigene auszuwählen, die mit einer hohen Immunogenität und klonalen Expansion tumorspezifischer T-Zellen assoziiert sind.

Insgesamt liefert der Abgleich mit früheren Studien wichtige Bestätigungen, aber auch neue Impulse für die Validierung von neoantigenspezifischer TCRs, die Entwicklung personalisierter Peptidvakzine und die präklinische Sicherheitsbewertung. Während viele Arbeiten primär die Detektion neoantigenspezifischer TCRs fokussierten, kombiniert diese Arbeit klonale Analysen, funktionelle Testsysteme und Sicherheitsaspekte und ermöglicht dadurch ein umfassenderes Verständnis der T-Zell-vermittelten Immunantwort nach Vakzinierung und leistet damit einen substantiellen Beitrag zur Weiterentwicklung TCR-basierter Immuntherapien.

Die Kombination klonaler Analysen mit funktionellen Testsystemen ermöglichte darüber hinaus erste Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen klonaler Expansion und antigenspezifischer Funktionalität. So zeigte sich insbesondere im Fall von KRAS^{G12V} bei Patient ALL0402, dass stark expandierte Klone auch funktionell aktiv und spezifisch auf das mutierte Peptid reagierten. Umgekehrt blieben TCRs aus polyklonalen Repertoires häufiger funktionell inaktiv. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass klonale Dominanz ein potenzieller Prädiktor für die funktionelle Relevanz eines TCRs sein könnte – ein Aspekt, der bei der Bewertung künftiger Vakzinierungsstudien gezielt berücksichtigt werden sollte.

4.3 Funktionelle Analyse transgener neoantigenspezifischer TCRs

Die funktionelle Analyse neoantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren stellt einen zentralen Schritt zur Bewertung ihres therapeutischen Potenzials dar. In dieser Arbeit erfolgte die Validierung ausgewählter TCR-Kandidaten mithilfe des OTR-Systems in Jurkat-TPR-Zellen. Dieses Modell erlaubt eine detaillierte Untersuchung der durch TCR-Signale induzierten Transkriptionsfaktoraktivierung (NF- κ B, NFAT, AP-1) nach Antigenstimulation. Der Einsatz eines reporterbasierten Testsystems ermöglicht dabei eine standardisierte, reproduzierbare Analyse – unabhängig von individuellen Schwankungen primärer T-Zellen.

Ein wesentliches Kriterium für die funktionelle Einschätzung eines TCRs ist seine Antigenpezifität, definiert durch eine selektive Reaktivität gegenüber tumorassoziierten Peptiden. Darüber hinaus ist die HLA-Restriktion von zentraler Bedeutung, da TCRs nur im Kontext spezifischer MHC-Moleküle eine effektive Antigenerkennung vermitteln können. Ergänzend ist die Fähigkeit zur Auslösung zellulärer Effektorfunktionen, insbesondere der Zytokinfreisetzung (z. B. IL-2, IFN γ), für die therapeutische Bewertung von Relevanz.

Die untersuchten TCRs wurden aus Patientinnen und Patienten der IVAC-ALL-1-Studie isoliert, die eine Vakzinierung mit tumorspezifischen Neoantigenen erhalten hatten. Zur funktionellen Charakterisierung wurden transgene TCRs mithilfe der CRISPR-Cas9-vermittelten Integration in Jurkat-TPR-Zellen exprimiert. Die Ko-Kultivierung dieser Zellen mit antigenpräsentierenden B-Zell-Blasten ermöglichte sowohl die Analyse tumorspezifischer Reaktivität als auch die Identifikation möglicher Kreuzreaktivitäten gegenüber unbehandelten autologen Zellen.

Die getesteten TCRs zeigten ein heterogenes funktionelles Aktivitätsprofil: Einige wiesen eine ausgeprägte Peptidreaktivität auf, während andere nur geringe oder unspezifische Signale zeigten. Ein besonderer Fokus lag auf KRAS^{G12V}-spezifischen TCRs, da KRAS-Mutationen in soliden Tumoren als klinisch relevantes Zielantigen gelten. Darüber hinaus wurden weitere TCRs analysiert, die Reaktivitäten gegenüber anderen Neoantigenen zeigten.

Die detaillierten Ergebnisse dieser funktionellen Untersuchungen – einschließlich der HLA-Restriktion, Effektorantworten und Aktivierungsmuster – werden in den folgenden Kapiteln systematisch diskutiert.

4.3.1 Funktionelle Testung IVAC-ALL-1-abgeleiteter TCRs im OTR-System

Ein besonderer Fokus lag auf den KRAS^{G12V}-spezifischen CD4⁺-TCRs aus Patient ALL0402, bei dem eine persistierende Immunantwort gegen das mutierte KRAS-Peptid dokumentiert werden konnte. Die klonale Analyse offenbarte eine ausgeprägte oligoklonale Expansion, insbesondere von TCR 2 und TCR 3. Funktionelle Tests bestätigten deren deutliche Peptidreaktivität nach Stimulation mit KRAS^{G12V}-beladenen B-Zell-Blasten, während TCR 1 keine spezifische Aktivität zeigte. HLA-Blockade-Experimente belegten eine Präsentation von TCR 2 über HLA-DR1 und von TCR 3 über HLA-DQ2, was deren eindeutige Restriktion auf MHC-Klasse-II-Moleküle belegt. Die Antigenstimulation führte zu einer signifikanten IL-2- und IFN γ -Freisetzung, die bei Verwendung des Wildtyp-Peptids (KRAS^{WT}) nicht nachweisbar war. Zusätzlich wurde eine selektive zytotoxische Aktivität gegenüber KRAS^{G12V}-beladenen Blasten beobachtet, während unbehandelte oder mit KRAS^{WT} beladene Zellen unbeeinflusst blieben – ein Hinweis auf eine peptidspezifische Funktionalität.

Weitere TCR-Kandidaten aus anderen Patientinnen und Patienten wurden ebenfalls funktionell analysiert. In Patient ALL0101 (ZCCHC3/D269fs, CD4⁺) wiesen TCR 7 und TCR 8 eine deutliche Peptidreaktivität auf, begleitet von einer signifikanten Induktion von NF- κ B- und NFAT-Signalen, was auf eine gezielte peptidinduzierte Expansion hindeutet.

Für Patient ALL0105 (L3MBTL4/M188I) wurden sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-TCRs getestet. Unter den CD4⁺-TCRs zeigten TCR 69 und TCR 19 eine deutliche Reaktivität gegenüber unbeladene B-Zell-Blasten, was eine potenzielle Kreuzreaktivität mit endogenen B-Zell-Antigenen nahelegt. TCR 17 und TCR 53 blieben hingegen funktionell inaktiv. Auch unter den CD8⁺-TCRs dieses Patienten zeigte sich ein heterogenes Bild: Während einige keine spezifische Reaktion zeigten, reagierten TCR 69 und TCR 19 erneut auf unbehandelten B-Zell-Blasten – ein sicherheitsrelevanter Befund, der weiterführende Untersuchungen erforderlich macht.

Bei Patient ALL0107 (ASAP3/A111V) wurden CD8⁺-TCRs identifiziert, die eine deutliche Aktivierung nach Antigenkontakt zeigten. Reporteranalysen belegten die Induktion von NF- κ B- und NFAT-Signalen, was auf eine spezifische Reaktivität gegenüber dem entsprechenden Impfpeptid hindeutet.

Für Patient ALL0112 (EXOC4/R574P) wurden sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-TCRs getestet. Während die Mehrheit funktionell inaktiv blieb, wiesen TCR 15 und TCR 16

eine signifikante Reaktivität gegenüber unbeladene B-Zell-Blasten auf. Diese Befunde deuten auf die mögliche Erkennung geteilter Epitope oder endogener Antigene hin.

Bei einzelnen Peptiden ließ sich sowohl in CD4⁺- als auch in CD8⁺-T-Zellen eine spezifische Reaktivität beobachten, obwohl sie ursprünglich als MHC-Klasse-II--restringiert vorhergesagt worden waren. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid SPOP D130Y, das bei Patient ALL0405 eine funktionelle Antwort in beiden T-Zell-Subsets auslöste. Dies könnte auf das Vorhandensein eines CD8⁺-Epitops innerhalb des längeren Peptids hinweisen oder auf eine Kreuzpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen zurückzuführen sein. Bioinformatische Prädiktionen hatten bereits potenzielle CD8⁺-Epitopregionen innerhalb bestimmter MHC-Klasse-II-Peptide nahegelegt. Solche Beobachtungen betonen die Bedeutung einer kombinierten funktionellen, bioinformatischen und experimentellen Evaluation der Peptidantworten für eine fundierte Interpretation der Immunreaktivität.

Insgesamt ergab sich ein heterogenes Bild: Die KRAS^{G12V}-spezifischen CD4⁺-TCRs induzierten eine klare peptidspezifische Immunantwort mit definierter HLA-Restriktion. Demgegenüber präsentierten sich die CD8⁺-TCRs in ihrer Funktionalität uneinheitlich – mit teils fehlender Reaktivität, teils potenzieller Kreuzreaktivität gegenüber physiologisch expremierten Antigenen auf nicht-malignen Zellen. Während die HLA-Restriktion der CD4⁺-TCRs eindeutig zugeordnet werden konnte, besteht für zahlreiche CD8⁺-TCRs weiterer Untersuchungsbedarf.

Ein besonders sicherheitsrelevanter Befund war die beobachtete Kreuzreaktivität einzelner TCRs mit unbehandelten autologen Blasten. Diese Reaktivitäten, insbesondere bei CD8⁺-TCRs aus Patient ALL0105 und ALL0112, deuten auf die potenzielle Erkennung physiologischer, möglicherweise B-Zell-assoziiierter Antigene hin. Denkbar sind geteilte Epitope, Autoantigene oder auch Kreuzreaktivitäten mit malignen Zielstrukturen. Die funktionelle Reaktion auf unbehandelte Blasten kann somit entweder Ausdruck einer unerwünschten Erkennung gesunder Gewebe sein – etwa im Fall ubiquitär exprimierter oder hämatopoetischer Antigene – oder im günstigsten Fall eine erwünschte Reaktivität gegenüber auch auf leukämischen Blasten präsentierten Zielantigenen darstellen. Letzteres wäre therapeutisch relevant. Da insbesondere B-Zellen für die hämatopoetische Regeneration entbehrlich sind, wäre eine gezielte TCR-Aktivität gegen B-Zell-Antigene zwar nicht ideal, aber klinisch tolerabel – anders als eine Reaktivität gegen essentielle Gewebe wie Stammzellen oder Herzmuskel. Die

genaue Identifikation der zugrunde liegenden Zielstruktur ist daher essenziell für die Risikoabschätzung und therapeutische Bewertung transgener TCRs.

Zur Beurteilung der Antigen-spezifität wurden in dieser Arbeit funktionelle Parameter wie die Aktivierung von NF- κ B, NFAT und AP-1 sowie die Zytokin-freisetzung herangezogen und durch HLA-Blockadeexperimente ergänzt. Diese mehrdimensionale funktionelle Charakterisierung erlaubt eine differenzierte Einschätzung potenzieller Sicherheitsrisiken. Die Notwendigkeit eines solchen stringenten Validierungsansatzes wird durch frühere klinische Studien unterstrichen, in denen TCR-vermittelte Kreuzreaktivität mit physiologisch exprimierten Proteinen zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen führten.

Vor diesem Hintergrund erscheint die Integration zusätzlicher bioinformatischer Prädiktionstools zur Bewertung potenzieller Kreuzantigenität zukünftig essenziell, um das Risiko unerwünschter Reaktivitäten weiter zu reduzieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass insbesondere für CD8⁺-TCRs eine umfassende präklinische Sicherheitsbewertung erforderlich ist, um Kandidaten mit ungünstigem Risikoprofil frühzeitig zu identifizieren und für die Weiterentwicklung TCR-basierter Therapien auszuschließen. Um das klinische Potenzial der untersuchten CD8⁺-TCRs fundiert bewerten zu können, sind weiterführende funktionelle und bioinformatische Analysen erforderlich, insbesondere zur Abgrenzung von *Off-Target*-Reaktivitäten.

Die quantitative Detektion des eCFP-basierten NF- κ B-Reporters war durch die Filterkonfiguration (BV421/BV510) des in Tübingen eingesetzten Durchflusszytometers (BD LSRFortessa™) technisch eingeschränkt, da das Emissionsmaximum von eCFP zwischen beiden Kanälen liegt. Während starke Signale visuell erkennbar waren, konnten insbesondere schwache Aktivierungen nicht zuverlässig quantifiziert werden. Eine klassische Kompensation war in diesem Modell nicht möglich, da die Reporter bereits konstitutiv in den Jurkat-TPR-Zellen integriert sind und somit keine induzierbaren Single-Positive-Kontrollen zur Verfügung standen. Diese limitierten Detektionsmöglichkeiten müssen bei der Interpretation insbesondere grenzwertiger Aktivierungen berücksichtigt werden. Künftig könnten Messungen an spezialisierten Geräten – etwa in der Core Facility – oder unter Einsatz alternativer Reporter-Konstrukte zusätzliche Präzision ermöglichen.

Das vollständige Ausbleiben einer Zytokinantwort trotz Peptidbeladung der Blasten nach HLA-Blockade belegt, dass die beobachtete T-Zell-Aktivierung durch spezifische TCR-Peptid-MHC-Interaktionen vermittelt wurde und stellt somit einen zentralen Nachweis für die funktionelle HLA-Restriktion der getesteten TCRs dar.

4.3.2 Relevanz der Ergebnisse für die Weiterentwicklung TCR-basierter Immuntherapien

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur funktionellen Charakterisierung peptidspezifischer T-Zell-Rezeptoren liefern wichtige Impulse für die Weiterentwicklung personalisierter, TCR-basierter Immuntherapien. Besonders hervorzuheben sind die KRAS^{G12V}-spezifischen CD4⁺-TCRs aus Patient ALL0402, die sich durch eine ausgeprägte Antigenspezifität, HLA-Klasse-II-Restriktion und funktionelle Aktivität auszeichneten und damit eine potenzielle Eignung für den therapeutischen Einsatz nahelegen. Ihre erfolgreiche Identifikation, Sequenzierung und Validierung im OTR-System demonstriert die prinzipielle Machbarkeit, neoantigenspezifische Rezeptoren patientenspezifisch zu isolieren und in einem standardisierten System funktionell zu testen – ein entscheidender Schritt hin zu einer therapeutischen Nutzung.

Ein zentraler Aspekt bei der Entwicklung transgener TCR-Therapien ist die Bewertung möglicher Sicherheitsrisiken. Während ein Teil der untersuchten TCRs eine hohe Selektivität für das jeweilige Zielpeptid aufwies, zeigten andere eine unerwartete Reaktivität gegenüber nicht mit Peptid beladenen beziehungsweise HLA-kompatiblen allogenen B-Zell-Blasten. Diese Kreuzreaktionen könnten auf die Erkennung geteilter Epitope oder physiologisch exprimierter B-Zell-assoziiierter Antigene hindeuten und bergen das Risiko unerwünschter *Off-Target*-Effekte, etwa im Sinne autoimmuner Nebenwirkungen.

Eine weitere Überlegung betraf die Frage, ob die klonale Zusammensetzung der detektierten T-Zellpopulationen mit der Anzahl oder Art der verabreichten Impfpeptide in Zusammenhang steht. Tatsächlich erhielten Patientinnen und Patienten mit höherer Peptidanzahl meist sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Peptide. Dennoch ließ sich kein konsistenter Trend zwischen der Gesamtzahl verabreichter Peptide und einer stärkeren Oligoklonalität oder Polyklonalität beobachten. Auch der gleichzeitige Einsatz von MHC-I- und MHC-II-Peptiden war nicht konsistent mit einer komplexeren klonalen Struktur assoziiert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die klonale Zusammensetzung der induzierten T-Zellantworten nicht allein vom Umfang der Vakzinierung abhängt, sondern maßgeblich durch individuelle Faktoren wie T-Zellrepertoire, Antigenverarbeitung und HLA-Kontext beeinflusst wird.

Ein besonders interessantes Beispiel stellt Patient ALL0106 dar, bei dem sowohl eine funktionelle Immunantwort im Immunmonitoring als auch eine klonale Expansion in der Einzelzellsequenzierung nachgewiesen werden konnte. Die für diesen Patienten isolierten TCRs reagierten spezifisch auf das verabreichte

Impfpeptid, was sich sowohl in Reporteraktivität als auch in Zytokinfreisetzung widerspiegelte. Diese Übereinstimmung funktioneller und klonaler Parameter unterstreicht das Potenzial einer kombinierten Betrachtung zur Identifikation klinisch relevanter TCR-Kandidaten.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die Art der Mutation, aus der das jeweilige Peptid abgeleitet wurde, einen Einfluss auf die klonale Struktur der T-Zellantwort haben könnte. Eine vergleichende Betrachtung der TCR-Repertoires bei Peptiden, die aus Punktmutationen (z. B. KRAS G12V) oder komplexeren Ereignissen wie Frameshift-Mutationen (z. B. ZCCHC3 D269fs) resultierten, ergab jedoch kein konsistentes Muster: Sowohl Punktmutationen als auch Frameshifts führten in einzelnen Fällen zu oligoklonalen als auch zu polyklonalen Antworten. Dies spricht dafür, dass nicht allein die Mutationsart, sondern auch andere Faktoren – etwa die Prozessierung des Peptids, die Bindungsaffinität zum MHC oder die Verfügbarkeit spezifischer T-Zellklone – die Immunogenität und die resultierende klonale Antwort maßgeblich beeinflussen.

Bindungsstärke und therapeutisches Potenzial

Die in dieser Arbeit charakterisierten KRAS^{G12V}-spezifischen TCRs zeigten eine funktionelle Reaktivität bei ausgewogener Bindungsstärke, was sie zu geeigneten Kandidaten für weiterführende präklinische Untersuchungen macht. Perspektivische Ansätze zur funktionellen Optimierung – etwa durch gezieltes TCR Engineering – werden im Ausblick (Kapitel 4.5.2) diskutiert.

Kombination mit anderen Immuntherapien

Die vorliegenden Daten liefern darüber hinaus wertvolle Anhaltspunkte für die Entwicklung kombinierter Immuntherapiekonzepte. Insbesondere die Kombination aus Peptidvakzinierung und Checkpoint-Inhibition hat sich in präklinischen und ersten klinischen Studien als vielversprechender Ansatz zur Reaktivierung tumorspezifischer T-Zellen erwiesen. Die Blockade inhibitorischer Signalachsen – etwa mittels PD-1/PD-L1- oder CTLA-4-Antikörpern – kann funktionell erschöpfte T-Zellen wieder aktivieren und so die Effektorfunktion antigenspezifischer TCRs potenzieren.

Ein exemplarischer Nachweis für die klinische Relevanz dieses Konzepts ergibt sich aus einem individuellen Heilversuch bei einer Patientin mit hepatozellulärem Karzinom, die nach Standardtherapie mit einer Kombination aus Peptidvakzinierung und Checkpoint-Blockade behandelt wurde. Hier konnte eine persistierende peptidpezifische T-Zell-Antwort induziert werden. Zwei der aus dieser Patientin

isolierten TCRs wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung des OTR-Systems in Tübingen genutzt und dort funktionell analysiert. Dieses Beispiel illustriert, dass Checkpoint-Inhibitoren als synergistisches Element zur Verstärkung impfinduzierter TCR-Antworten fungieren können – insbesondere in immunsupprimierten Tumormilieus, die einer eigenständigen Immunaktivierung entgegenstehen.

Translation in die klinische Anwendung

Für die Translation der hier charakterisierten TCRs in die klinische Anwendung sind weitere Voraussetzungen zu erfüllen. Da eine umfassende Sicherheitsbewertung in vollständig humanisierten *in vivo* Modellen derzeit technisch kaum realisierbar ist, kommt der präklinischen *in vitro* Validierung mit mehrdimensionalen funktionellen Assays sowie ergänzenden bioinformatischen Analysen besondere Bedeutung zu. Darüber hinaus ist die Auswahl geeigneter Patientenkohorten essenziell, da TCRs in ihrer Wirksamkeit an spezifische HLA-Typen gebunden sind. Eine zielgerichtete HLA-Typisierung sowie der Aufbau HLA-spezifischer TCR-Bibliotheken könnten hierzu einen Beitrag leisten.

Auch die Herstellung TCR-transgener T-Zellen unter GMP-Bedingungen stellt eine Herausforderung dar. Derzeit basieren die meisten Herstellungsprotokolle auf mehrwöchiger Expansion in geschlossenen Kultursystemen, was zeit- und ressourcenintensiv ist. Fortschritte in der CRISPR-Cas9-Technologie, kombiniert mit automatisierten Zellverarbeitungsplattformen, könnten künftig zur Effizienzsteigerung und Standardisierung der Herstellung beitragen.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Daten unterstreichen die Relevanz gezielter funktioneller TCR-Validierungen für die Entwicklung sicherer und effektiver Immuntherapien. Die KRAS^{G12V}-spezifischen CD4⁺-TCRs zeigten eine peptidspezifische Reaktivität mit hoher funktioneller Aktivität und HLA-Klasse-II--Restriktion – Eigenschaften, die sie zu vielversprechenden Kandidaten für die therapeutische Weiterentwicklung machen. Gleichzeitig verdeutlichen die beobachteten Kreuzreaktionen einzelner CD8⁺-TCRs mit autologen B-Zell-Blasten die Notwendigkeit sorgfältiger Sicherheitsprüfungen zur Minimierung potenzieller *Off-Target*-Effekte, was die Notwendigkeit zur Etablierung geeigneter *in silico* Vorhersagen hervorhebt. Kombinationstherapien, etwa mit Checkpoint-Inhibitoren, könnten das therapeutische Potenzial antigenspezifischer TCRs weiter erhöhen. Die klinische Umsetzung entscheidend davon abhängen, inwieweit standardisierte, skalierbare Herstellungsprozesse und HLA-angepasste Patientenselektion realisiert werden können.

Zur belastbaren Bewertung des therapeutischen Potenzials dieser TCRs sind weiterführende funktionelle Studien erforderlich, insbesondere im Hinblick auf Persistenz, Kreuzreaktivität und *in vivo* Wirksamkeit. Perspektivisch könnten auch die Gestaltung des Impfprotokolls und die Wahl des Adjuvans einen Einfluss auf die Qualität der T-Zellantwort nehmen. Neue Entwicklungen – etwa der Einsatz von XS15 als Adjuvans in verkürzten Impfreimen – eröffnen hier zusätzliche Möglichkeiten, deren Einfluss auf die klonale Auswahl und Funktionalität der induzierten TCRs in künftigen Studien gezielt untersucht werden sollte.

4.4 Klinische Relevanz neoantigenspezifischer TCRs und Perspektiven für personalisierte Immuntherapien

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur funktionellen Charakterisierung neoantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis T-Zell-vermittelter Immunantworten im Kontext personalisierter Peptidvakzinierung. Die Daten zeigen, dass durch gezielte Vakzinierungsstrategien neoantigenspezifische TCRs induziert werden können, die klonal expandieren und eine funktionelle Aktivität entfalten. Durch den Einsatz des OTR-Systems war es möglich, diese selektierten TCRs unabhängig von Primärzellkulturen standardisiert funktionell zu validieren.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass neoantigenspezifische TCRs eine präzise Immunantwort vermitteln können, zugleich aber auch potenzielle Sicherheitsrisiken bergen. Einige TCR-Kandidaten zeigten unerwartete Kreuzreaktivitäten mit unbehandelten autologen oder HLA-kompatiblen allogenen B-Zell-Blasten, was auf die mögliche Erkennung geteilter Epitope oder endogener B-Zell-assoziiierter Antigene hinweist. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass eine sorgfältige funktionelle und bioinformatische Sicherheitsbewertung integraler Bestandteil der Entwicklung TCR-basierter Immuntherapien sein muss. Die frühzeitige Integration entsprechender Validierungsschritte in das Studiendesign künftiger Vakzinierungsstrategien könnte entscheidend dazu beitragen, selektivere T-Zell-Antworten zu generieren und das Risiko unerwünschter Immunreaktionen zu minimieren.

Ein Beispiel für eine zielgerichtete, aber nicht-personalisierte Immuntherapie ist der bispezifische CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab. In zwei großen klinischen

Studien konnte damit bei pädiatrischen Patientinnen und Patienten mit rezidivierter B-ALL eine signifikante Verlängerung des rezidivfreien Überlebens erzielt werden [194, 195]. Solche Strategien adressieren definierte Oberflächenantigene wie CD19, deren Verlust allerdings zur Therapieresistenz führen kann [196]. Demgegenüber eröffnen personalisierte Multi-Peptidvakzinen die Möglichkeit, multiple patientenspezifische, intrazelluläre Zielstrukturen wie Neoantigene zu adressieren – ein entscheidender Vorteil bei malignen Erkrankungen mit hoher interindividueller Heterogenität.

Auch das CD22-spezifische Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Inotuzumab Ozogamicin wurde in klinischen Studien zur Behandlung refraktärer oder rezidivierter B-ALL bei Kindern und Jugendlichen erfolgreich eingesetzt. In einer multizentrischen Studie unter der Leitung der *Children's Oncology Group* zeigte sich eine hohe Ansprechrate, selbst in schwer vorbehandelten Kohorten [197]. So eindrucksvoll die Wirksamkeit solcher antigenbasierten Therapien ist, bleibt ihre Zielstruktur auf definierte Oberflächenmarker limitiert und führen häufig langfristig zur Resistenzbildung. TCR-basierten Strategien unterscheiden sich hierin grundlegend, da sie auf intrazelluläre, über MHC-präsentierte Peptidstrukturen abzielen und somit ein wesentlich eiteres Spektrum potenzieller Zielantigene adressieren können.

Für bislang schwer immuntherapeutisch adressierbare Entitäten wie T-Zell-Leukämien (T-ALL) wurden mit CD7-spezifischen CAR-T-Zellen mittlerweile vielversprechende Ergebnisse erzielt. Eine Phase-I-Studie demonstrierte bereits 2021 eine hohe Remissionsraten bei vertretbarem Sicherheitsprofil, was den Weg für weiterführende klinische Studien ebnete [198]. Diese Ergebnisse verdeutlichen das wachsende Potenzial zielgerichteter Immuntherapien auch in der T-ALL und unterstreichen die Relevanz der Entwicklung TCR-basierter Strategien, sofern tumorspezifische Zielantigene sicher identifiziert und validiert werden können.

Die Überführung der hier präsentierten Ergebnisse in die klinische Anwendung erfordert jedoch eine konsequente Weiterentwicklung sowohl methodischer als auch regulatorischer Konzepte. In den folgenden Abschnitten werden daher zentrale Herausforderungen und Perspektiven diskutiert, die für die erfolgreiche klinische Translation personalisierter TCR-Therapien künftig entscheiden sein dürfte.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen exemplarisch, dass funktionell validierte, neoantigenspezifische TCRs eine Brücke zwischen individueller Immunantwort und standardisierbarer Zelltherapie bilden können – vorausgesetzt, Sicherheit und Zielstruktur werden präzise definiert.

4.4.1 Spezifitätsanalysen und funktionelle Sicherheitsbewertung neoantigenspezifischer TCRs

Die klinische Anwendbarkeit neoantigenspezifischer TCRs hängt maßgeblich von ihrer Antigen-spezifität und ihrem Sicherheitsprofil ab. Im Gegensatz zu TCRs, die gegen überexprimierte tumorausassoziierte Selbstantigene gerichtet sind, bieten TCRs mit Spezifität für tumorindividuelle Neoantigene konzeptionell ein günstigeres Verhältnis von Wirksamkeit und Sicherheit. Da Neoantigene infolge somatischer Mutationen ausschließlich im malignen Gewebe entstehen, lässt sich durch die gezielte Auswahl entsprechender Peptidsequenzen eine höhere funktionelle Selektivität erreichen, was das Risiko für *Off-Target*-Reaktivitäten gegenüber gesundem Gewebe grundsätzlich reduziert.

Gleichwohl zeigte die in dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Analyse, dass auch einzelne TCRs mit vermeintlicher Spezifität für Neoantigene eine Reaktivität gegenüber unbeladenen autologen beziehungsweise HLA-kompatiblen allogenen B-Zell-Blasten aufweisen können. Dieser Befund legt nahe, dass potenzielle Kreuzreaktivitäten selbst bei streng selektierten TCRs nicht ausgeschlossen werden können. Mögliche Erklärungen reichen von der Erkennung geteilter Epitope mit struktureller Ähnlichkeit zu Neoantigenen bis hin zu bislang nicht vollständig verstandenen, antigenunabhängigen Aktivierungsmustern.

Von besonderem Interesse ist, dass diese *in vitro* nachgewiesenen Kreuzreaktionen nicht mit klinisch relevanten Nebenwirkungen in Zusammenhang standen: In der IVAC-ALL-1-Studie erhielten 15 Patientinnen und Patienten eine personalisierte Peptidvakzinierung, von denen viele über Jahre hinweg eine stabile Krankheitskontrolle zeigten. Die Kreuzreaktionen wurden sowohl gegenüber autologen als auch – in Fällen mit fehlendem Eigenmaterial – gegenüber HLA-kompatiblen allogenen B-Zell-Blasten beobachtet. Letzteres lässt die Möglichkeit einer HLA-Kreuzreaktivität offen. Die insgesamt fehlende Korrelation mit klinischen Nebenwirkungen legt jedoch nahe, dass zumindest ein Teil der *in vitro* detektierten Reaktivitäten keine pathophysiologische Relevanz besitzt.

Diese Langzeitverläufe legen nahe, dass die *in vitro* beobachteten Reaktivitäten gegenüber unbeladenen autologen Zellen beziehungsweise HLA-kompatiblen APCs *in vivo* möglicherweise eine abweichende Bedeutung haben können. Eine denkbare Hypothese ist, dass selektive Reaktivitäten gegenüber malignen B-Zell-Klonen bestehen bleiben, während gesunde Zellpopulationen funktionell geschont werden – ein Mechanismus, der in seiner Wirkung einem *Graft-versus-Leukemia*-(GvL)-Effekt ähneln könnte.

Diese Annahme wird durch Beobachtungen aus der allogenen Stammzelltransplantation gestützt, bei der ein milder GvL-Effekt durch T-Zell-vermittelte Reaktivität gegenüber residuellen leukämischen Zellen zu einer langfristigen Krankheitskontrolle beitragen kann [199]. Dazu wären prospektive Analysen erforderlich, in denen sowohl die Zielstrukturen potenziell kreuzreaktiver TCRs als auch deren funktionelle Auswirkungen auf gesunde Gewebe in präklinischen Modellen systematisch untersucht werden.

Für eine zuverlässige Sicherheitsbewertung ist eine Kombination funktionellen und bioinformatischen Strategien unabdingbar. Experimentelle *in vitro* Modelle mit primären Zellen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs ermöglichen die Untersuchung potenzieller *Off-Target*-Effekte in unterschiedlichen Gewebekontexten. Ergänzend können bioinformatische Tools genutzt werden, um erkannte CDR3-abhängige Sequenzmotive mit physiologisch exprimierten humanen Proteinen zu vergleichen und strukturelle Ähnlichkeiten zu identifizieren.

Darüber hinaus stellt die strukturbasierte Affinitätsmodulation weiteren Ansatz zur Verbesserung der Sicherheit dar. Insbesondere gezielte Modifikationen innerhalb der CDR3-Region könnten die Spezifität der TCR-Antigenbindung erhöhen, ohne dabei die Erkennung endogener Peptide zu verstärken. Solche Optimierungsstrategien könnten dazu beitragen, die therapeutische Breite zu erhöhen und gleichzeitig das Risiko autoimmuner Nebenwirkungen zu minimieren.

Auch immunmodulatorische Begleitstrategien, etwa die Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren, könnten zur funktionellen Verstärkung impfinduzierter T-Zell-Antworten beitragen. In präklinischen Modellen und ersten klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Blockade inhibitorischer Signalachsen wie PD-1/PD-L1 oder CTLA-4 eine Reaktivierung tumorspezifischer T-Zellen begünstigen und damit die Wirksamkeit von Peptidvakzinen potenzieren kann [13, 18]. Allerdings erfolgt diese Immunaktivierung unspezifisch, sodass auch autoreaktive T-Zell-Klone entfesselt werden können – ein Aspekt, der in der klinischen Anwendung sorgfältig berücksichtigt werden muss, um das Risiko immunvermittelter Nebenwirkungen zu minimieren.

Insgesamt verdeutlichen die hier präsentierten Daten, dass neoantigenspezifische TCRs ein hohes funktionelles und therapeutisches Potenzial aufweisen, zugleich aber in Einzelfällen unerwartete Reaktivitäten gegenüber autologem Gewebe zeigen können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, potenzielle *Off-Target*-Effekte frühzeitig durch stringente funktionelle und bioinformatische Testsysteme zu identifizieren – ohne therapeutische nutzbare Reaktivitäten per se auszuschließen.

4.4.2 Affinitätsmodulation und funktionelle Optimierung neoantigenspezifischer TCRs

Die Effektivität TCR-basierter Immuntherapie hängt wesentlich von der Affinität des jeweiligen Rezeptors zum spezifischen Peptid-MHC-Komplex ab. Eine unzureichende Affinität kann die T-Zell-Aktivierung und damit die Tumorerkennung limitieren, während eine überhöhte Bindungsstärke Risiko unspezifischer Aktivierung oder autoimmuner Reaktionen birgt. Für den klinischen Einsatz neoantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren ist daher die Etablierung eines fein austarierten Gleichgewichts zwischen Spezifität und funktioneller Sensitivität essenziell.

Ein vielversprechender Ansatz zur gezielten Affinitätsmodulation liegt im strukturbasierten TCR-Engineering – insbesondere durch gezielte Veränderungen in der CDR3-Region, die den primären Kontakt mit dem Peptid-MHC-Komplex vermittelt und maßgeblich für Spezifität und Affinität verantwortlich ist. Mehrere Studien belegen, dass gezielte Modifikationen innerhalb der CDR3-Sequenz die Affinität gegenüber dem Zielantigen erhöhen können, ohne die Antigenpezifität zu kompromittieren [200]. Solche Strategien könnten auch für die in dieser Arbeit identifizierten neoantigenspezifischen TCRs – insbesondere KRAS^{G12V}-spezifische TCRs – genutzt werden, um deren therapeutisches Potenzial weiter auszubauen.

Neben strukturellen Optimierungen auf Ebene des Rezeptors spielt auch die intrazelluläre Signalverstärkung eine zentrale Rolle für die Effektorfunktion TCR-transgener T-Zellen. Die Ko-Expression kostimulatorischer Signalmoleküle wie CD28 oder 4-1BB kann sowohl die Aktivierung als auch die Persistenz und Proliferationsfähigkeit dieser Zellen steigern. Dies gilt insbesondere für tumorspezifische CD4⁺-T-Zellen, die nicht nur antigenreaktiv sind, sondern zusätzlich durch die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine zur langfristigen Stabilisierung der Immunantwort beitragen können.

Ein klinisch relevantes Beispiel für die funktionelle Weiterentwicklung zellulärer Immuntherapien ist die CD7-spezifische CAR-T-Zelltherapie bei refraktärer T-ALL. Während klassische CAR-T-Zelltherapien bei CD19-positiven B-ALL-Formen etabliert sind, eröffnet der CD7-Ansatz erstmals einen therapeutischen Zugang für T-Zell-Leukämien [198]. Diese Fortschritte unterstreichen, dass gezielte Modifikation und strenge Validierung tumor- und patientenspezifischer Rezeptoren auch für bislang schwer behandelbare Entitäten neue Therapieoptionen erschließen können.

Darüber hinaus spielt die Wahl geeigneter *ex vivo* Protokolle zur Expansions- und Aktivierung eine zentrale Rolle für die Generierung funktionsstabiler T-Zellprodukte. Während IL-2-basierte Kulturbedingungen nach wie vor weit verbreitet sind, deuten neuere Studien darauf hin, dass eine Kombination aus IL-7 und IL-15 die Langlebigkeit, Differenzierung und Funktionalität von TCR-transgenen T-Zellen positiv beeinflussen kann [201]. Eine solche Optimierung der Kulturbedingungen könnte die Herstellung leistungsfähiger und langlebiger T-Zellen erleichtern und somit einen entscheidenden Beitrag zur Effektivität der adoptiven Zelltherapie leisten.

Ergänzend hierzu gewinnen Technologien zur selektiven Identifikation und Bewertung hochspezifischer TCRs zunehmend an Bedeutung. Hochdurchsatz-Screeningverfahren in Kombination mit bioinformatischen Modellen zur Prädiktion TCR-Peptid-MHC-abhängiger Interaktionen bieten das Potenzial, sowohl die Effektivität als auch die Sicherheit künftiger TCR-Therapien systematisch zu verbessern [202].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die gezielte Steigerung der Affinität neoantigenspezifischer TCRs sowie deren funktionelle Optimierung durch Signalverstärkung, T-Zell-Konditionierung und selektive Auswahlstrategien zentrale Elemente für die Weiterentwicklung TCR-basierter Immuntherapien darstellen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten – insbesondere zu den KRAS^{G12V}-spezifischen CD4⁺-TCRs – bilden eine relevante Grundlage für weiterführende Studien zur strukturellen und funktionellen Verfeinerung tumorspezifischer Rezeptoren im Blick auf Sicherheit, Wirksamkeit und klinische Anwendbarkeit.

Zukünftig könnten struktur- und künstliche Intelligenz (KI)-gestützte Prädiktionsmodelle helfen, Affinität und Spezifität gezielter vorherzusagen und so die Auswahl vielversprechender TCR-Kandidaten effizienter zu gestalten.

4.4.3 Klinische Translation neoantigenspezifischer TCRs - Herausforderungen und Perspektiven

Die klinische Translation neoantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren bleibt eine zentrale Herausforderung der Immuntherapieforschung. Während TCR-basierte Therapien bereits in ersten klinischen Studien zur Behandlung solider Tumoren eingesetzt werden, bedarf es weiterhin umfassender Optimierungsschritte hinsichtlich Sicherheit, Wirksamkeit und zielgerichteter Anwendbarkeit. Die in dieser Arbeit funktionell validierten, durch Peptidvakzinierung selektionierten TCRs

veranschaulichen das Potenzial dieses Ansatzes zur gezielten Induktion neoantigenspezifischer T-Zellantworten.

Erste klinische Erfolge, etwa mit NY-ESO-1- oder MAGE-A4-spezifischen TCRs, verdeutlichen die Wirksamkeit hochaffiner Rezeptoren in adoptiven Zelltherapien gegen solide Tumoren [203, 204]. Diese Studien belegen, dass tumorspezifische TCRs mit hoher Affinität an Neoantigene binden und in der Lage sind, eine gezielte Immunantwort gegen Tumorgewebe zu vermitteln. Gleichwohl bestehen weiterhin wesentliche Hürden, die für eine breite klinische Anwendung adressiert werden müssen. Eine zentrale Limitation stellt hierbei die zuverlässige Vorhersage geeigneter Peptidkandidaten dar – insbesondere im Bereich der MHC-Klasse-II-restringierten Antigene. Während bioinformatische Algorithmen zur Vorhersage von MHC-Klasse-I-Peptiden bereits eine vergleichsweise hohe Präzision erreicht haben, bleibt die computergestützte Identifikation immunogener MHC-Klasse-II-Peptide eine Herausforderung. Dies ist insbesondere auf die variable Länge der präsentierten Peptide sowie auf die konformationelle Flexibilität der MHC-Klasse-II-Moleküle zurückzuführen.

Aktuell erfolgt die PeptidAuswahl häufig auf Basis sogenannter *Core-Epitope* – kurzer Peptidsequenzen, die insbesondere für MHC-Klasse-I vorhergesagt und durch flankierende Aminosäuren verlängert werden. Für MHC-Klasse-II-Peptide erweist sich dieses Vorgehen jedoch als nur bedingt geeignet, da die resultierenden längeren Peptide nicht zuverlässig mit funktioneller Immunogenität korrelieren. Die in dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Validierung tumorspezifischer TCRs bietet die Möglichkeit, immunrelevante Strukturmerkmale direkt zu identifizieren. Der Abgleich validierter TCR-Sequenzen mit vorhergesagten Peptiden könnte zur Entwicklung präziserer Selektionskriterien beitragen und langfristig in verbesserte Vorhersagealgorithmen münden, um immunogene Peptide für zukünftige Vakzinierungsstudien gezielter auszuwählen.

Neben der Weiterentwicklung bioinformatischer Modelle können experimentelle Validierungsverfahren wie MHC-Bindungstests, Massenspektrometrie und TCR-Peptid-Interaktionsanalysen die Auswahl weiter verfeinern. Diese Methoden ermöglichen es, falsch-positive Peptidkandidaten frühzeitig auszuschließen und gleichzeitig hochaffine, immunogene Peptide zu identifizieren. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten TCR-Sequenzen könnten hierbei als Referenzsystem dienen, um retrospektiv immunogene Peptide zu validieren und künftige Impfstoffdesigns weiter zu optimieren.

Ein weiterer zentraler Aspekt für die klinische Translation ist die Sicherheitsbewertung neoantigenspezifischer TCRs. In dieser Arbeit zeigten

mehrere Rezeptoren eine unerwartete Reaktivität gegenüber unbeladenen B-Zell-Blasten, sowohl autologen als auch HLA-kompatiblen allo genen Ursprungs, darunter TCR 69 und TCR 19 (Patient ALL0105, L3MBTL4/M188I) sowie TCR 15 und TCR 16 (Patient ALL0112, EXOC4/R574P). Diese Befunde deuten auf eine mögliche Erkennung geteilter Epitope oder endogener B-Zell-assoziiertes Antigene hin – potenzielle *Off-Target*-Effekte, die das Risiko autoimmuner Nebenwirkungen bergen. Eine umfassende funktionelle und bioinformatische Charakterisierung ist daher unerlässlich, um Sicherheitsbedenken frühzeitig zu erkennen und zu adressieren. Langfristig könnten auch gezielte strukturelle Modifikationen an der TCR-Molekülstruktur – etwa zur Verbesserung der Antigen-spezifität – zu mehr Sicherheit beitragen. Eine vertiefte Diskussion dieses Konzepts erfolgt im Ausblick (Kapitel 4.5.2).

Bemerkenswert ist jedoch, dass diese Kreuzreaktivitäten in der IVAC-ALL-1-Studie nicht mit klinisch nachteiligen Effekten assoziiert waren. Ein Großteil der Patientinnen und Patienten zeigte auch Jahre nach der Vakzinierung stabile Krankheitsverläufe. Dies eröffnet die Hypothese, dass eine moderate, selektive Kreuzreaktivität gegenüber malignen B-Zell-Klonen – analog zu einem *Graft-versus-Leukemia*-Effekt – therapeutisch nützlich sein könnte, sofern gesunde Gewebe funktionell geschont bleiben.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz liegt in der Kombination peptidbasierter Vakzinierung mit Checkpoint-Inhibition oder adoptiver T-Zell-Therapie. Erste klinische Studien belegen, dass die Kombination dieser Strategien zur Reaktivierung funktionell erschöpfter T-Zellen führen kann und die Persistenz tumorspezifischer Immunantworten erhöht [205]. Insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit immunsuppressivem Tumormikromilieu bietet dieser multimodale Ansatz ein hohes Potenzial zur Verstärkung der therapeutischen Wirkung. Ein exemplarisches Beispiel liefert der individuelle Heilversuch bei einer Patientin mit hepatozellulärem Karzinom, die nach Abschluss der Standardtherapie mit einer Kombination aus Peptidvakzinierung und Checkpoint-Inhibition behandelt wurde. Dabei konnte eine persistierende tumorspezifische Immunantwort induziert werden; die Patientin blieb auch im Langzeitverlauf rezidivfrei. Zwei aus dieser Patientin isolierte TCRs wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung des OTR-Systems in Tübingen genutzt und dort funktionell validiert. Während der TCR AR P3-6 unter den getesteten Bedingungen keine Aktivität zeigte, vermittelte AR P4-4/P5-7 nach Antigenstimulation in Ko-Kultur mit beladenen NALM-6- oder MCF-7-Zellen eine deutliche Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NFAT – ein Hinweis darauf, dass dieser TCR in der Lage ist, den erkannten Peptid-MHC-Komplex spezifisch zu binden und eine funktionelle Signalweiterleitung auszulösen.

Diese funktionellen Befunde konnten durch eine tetramerbasierte Validierung zusätzlich gestützt werden: Der TCR AR P4-4/P5-7 zeigte eine spezifische Bindung an ein mit dem Impfpeptid beladenes Tetramer, wobei eine klar abgegrenzbare doppelt tetramerpositive Population (Q2: PE⁺/APC⁺) detektiert wurde. In den Kontrollbedingungen – entweder ohne Tetramierzugabe oder unter Verwendung eines mit einem irrelevanten Peptid beladenen Tetramers – blieb ein entsprechendes Signal aus. Der Nachweis der selektiven Peptidbindung ergänzt die reporterbasierte Aktivierungsanalyse und bestätigt die funktionelle Spezifität dieses TCRs auf struktureller Ebene. Im Gegensatz dazu zeigte der ebenfalls aus dieser Patientin isolierte TCR AR P3-6 unter identischen Bedingungen kein Tetramersignal, was die zuvor beobachtete geringe funktionelle Reaktivität zusätzlich stützt.

Zugleich bestätigt dieses Ergebnis die erfolgreiche Etablierung und Funktionsfähigkeit des OTR-Systems in Tübingen. Der Fall verdeutlicht das klinische Potenzial kombinierter Immunstrategien zur nachhaltigen Aktivierung tumorspezifischer T-Zellantworten im posttherapeutischen Setting.

4.4.4 Personalisierte Immuntherapien: Perspektiven und künftige Anwendungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur funktionellen Charakterisierung neoantigenspezifischer TCRs liefern eine wesentliche Grundlage für die Weiterentwicklung personalisierter Immuntherapien. Die erfolgreiche Identifikation und Validierung dieser Rezeptoren zeigt, dass neoantigenspezifische T-Zellantworten gezielt durch Peptidvakzinierung induzierbar werden können. Die Kombination aus Einzelzellsequenzierung und OTR ermöglichte eine präzise Analyse der Antigenpezifität und funktionellen Kapazität der jeweiligen TCRs. Diese Methodik stellt damit eine tragfähige Basis für die Entwicklung individualisierter TCR-Therapien dar, die auf den spezifischen Immunstatus einzelner Patientinnen und Patienten zugeschnitten sind.

Ein entscheidender Fortschritt liegt in der Verknüpfung bioinformatischer Peptidvorhersagen mit experimenteller Validierung. Während die computergestützte Auswahl geeigneter MHC-Klasse-II-Peptide nach wie vor mit Unsicherheiten behaftet ist, ermöglichen funktionell validierte TCRs - wie die in dieser Arbeit untersuchten - eine Rückkopplung an die Peptidvorhersage. Diese TCRs können als Referenzsystem dienen, um die immunogene Relevanz

vorhergesagter Peptide retrospektiv zu bewerten und daraus strukturelle Merkmale immunogener Zielstrukturen abzuleiten. Langfristig könnten diese Erkenntnisse zur Verbesserung prädiktiver Algorithmen beitragen und die Auswahl geeigneter Impfpeptide in zukünftigen Studien präzisieren.

Zur Verbesserung der PeptidAuswahl ist eine enge Verzahnung bioinformatischer Vorhersagemethoden mit experimentellen Validierungsverfahren erforderlich. Techniken wie MHC-Bindungstests, massenspektrometriebasierte Peptididentifikation aus Tumorproben oder antigenpräsentierenden Zellen sowie funktionelle TCR-Peptid-Interaktionsanalysen können komplementär eingesetzt werden, um vorhergesagte Epitope auf ihre tatsächliche Präsentation und Immunogenität hin zu überprüfen. Die Kombination dieser Ansätze erlaubt es, falsch positive Kandidaten frühzeitig auszuschließen, immunrelevante Peptide gezielter zu identifizieren und die Leistungsfähigkeit prädiktiver Algorithmen kontinuierlich zu verbessern.

Ein weiterer limitierender Faktor für die klinische Umsetzung personalisierter TCR-Therapien ist die effiziente Herstellung tumorspezifischer T-Zellen. Während in dieser Arbeit TCRs erfolgreich in Jurkat-TPR-Zellen exprimiert und funktionell getestet wurden, bedarf es für die klinische Anwendung standardisierter Protokolle zur genetischen Modifikation, Expansion und Qualitätskontrolle patienteneigener T-Zellen. Die hier etablierte OTR-Technologie bietet hierfür einen funktionellen Rahmen, der zukünftig auch zur Modifikation primärer T-Zellen genutzt werden könnte. Ergänzend könnten kulturbasierte Optimierungsstrategien – etwa durch den Einsatz von IL-7 und IL-15 – die Persistenz und Effektorfunktion adoptiv übertragener T-Zellen verbessern und ihren klinischen Nutzen weiter steigern.

Neben der Optimierung einzelner Komponenten erscheint insbesondere die Kombination tumorspezifischer TCR-Therapien mit weiteren immunologischen Strategien vielversprechend. So könnten Checkpoint-Inhibitoren dazu beitragen, tumorspezifische T-Zellen funktionell zu reaktivieren und deren Erschöpfung im Tumormikromilieu zu verhindern. Ebenso lässt sich durch die kombinierte Anwendung von Peptidvakzinierung und adoptivem TCR-T-Zelltransfer eine verstärkte Immunantwort erzielen: Während die Vakzinierung endogene tumorspezifische T-Zellen expandiert, könnte der Transfer *ex vivo* generierter TCR-transgener T-Zellen zusätzliche Effektorzellen bereitstellen.

Langfristig wird die Weiterentwicklung personalisierter TCR-Therapien maßgeblich durch technologische Fortschritte in Sequenzierung, Bioinformatik, Zellproduktion und Genomeditierung vorangetrieben werden. Neue Plattformen zur Hochdurchsatzanalyse von TCR-Repertoires, standardisierte

Zellmanipulationssysteme sowie innovative präklinische Testverfahren – etwa auf der Basis von Tumororganoiden oder humanisierten Modellen – könnten dazu beitragen, Sicherheit, Wirksamkeit und klinische Umsetzbarkeit dieser Therapien entscheidend zu verbessern.

Erste klinische Studien mit TCR-modifizierten T-Zellen liefern bereits vielversprechende Ergebnisse, doch bleiben zentrale Fragen hinsichtlich ihrer Langzeitpersistenz, funktionellen Stabilität und Sicherheit offen [206]. Perspektivisch könnten innovative Konzepte wie synthetische TCR-Signalverstärker, duale TCR/CAR-T-Strategien oder der Einsatz komplexer Zellkulturmodelle – etwa auf der Basis von Tumororganoiden oder humanisierten Modellen – dazu beitragen, Sicherheit, Wirksamkeit und klinische Umsetzbarkeit dieser Therapien entscheidend zu verbessern.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass personalisierte TCR-Therapien ein hohes Potenzial zur zielgerichteten Immuntherapie maligner Erkrankungen bieten. Die gezielte Verbesserung der PeptidAuswahl, die funktionelle Optimierung der TCR-Affinität sowie die Entwicklung effizienter Herstellungsverfahren sind dabei essenzielle Voraussetzungen für eine erfolgreiche klinische Translation. In Kombination mit präziser Antigenidentifikation und immunmodulatorischen Therapieansätzen könnten so individualisierte Behandlungsstrategien entstehen, die Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten neue therapeutische Optionen eröffnen. Eine kontinuierliche Weiterentwicklung dieser Konzepte dürfte wesentlich zur weiteren Verbesserung der klinische Anwendbarkeit und Wirksamkeit TCR-basierter Immuntherapien beitragen.

4.5 Ausblick

Die funktionelle Charakterisierung neoantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren liefert wertvolle Impulse für die Weiterentwicklung personalisierter, TCR-basierter Immuntherapien. Die erfolgreiche Identifikation, funktionelle Validierung und erste Sicherheitsbewertung mehrerer TCR-Kandidaten belegen die prinzipielle Umsetzbarkeit einer gezielten, peptidspezifischen Immunaktivierung durch personalisierte Vakzinierung.

Zugleich verdeutlichen die erhobenen Daten auch bestehende methodische und konzeptionelle Herausforderungen – etwa in Bezug auf die Vorhersagbarkeit

immunogener Peptide, die Standardisierung präklinischer Validierungsstrategien oder die Herstellung transgener T-Zellen unter klinischen Bedingungen. Um das translationale Potenzial TCR-basierter Therapien langfristig zu realisieren, sind weiterführende technologische, bioinformatische und immunologische Entwicklungen erforderlich - insbesondere zur Verbesserung von Sicherheit, Funktionalität und klinischer Umsetzbarkeit.

4.5.1 Sicherheitsrelevante Aspekte peptidspezifischer TCRs in der klinischen Entwicklung

Für die klinische Anwendung TCR-basierter Therapien stellt die präzise Bewertung der Antigenpezifität und potenzieller Off-Target-Reaktivitäten eine zentrale Voraussetzung dar. Die *in vitro* beobachteten Kreuzreaktionen unterstreichen die Notwendigkeit, Sicherheitsaspekte frühzeitig und systematisch zu adressieren.

Die funktionelle Relevanz solcher Kreuzreaktionen im *in vivo* Kontext bleibt bislang unklar. Bemerkenswert ist jedoch, dass in der IVAC-ALL-1-Studie keine klinisch relevanten Nebenwirkungen beobachtet wurden – trotz dokumentierter *in vitro* Reaktivitäten. Einige Patientinnen und Patienten zeigten über Jahre hinweg eine stabile Krankheitskontrolle. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen erscheint es plausibel, dass eine selektive Kreuzreaktivität – etwa im Sinne eines *Graft-versus-Leukemia*-Effekts – einen therapeutischen Nutzen entfalten könnte, sofern gesunde Gewebe funktionell geschont bleiben.

Diese Annahme wird gestützt durch Beobachtungen aus der allogenen Stammzelltransplantation, bei der ein milder GvL-Effekt zur Krankheitskontrolle beiträgt, ohne schwerwiegende *Graft-versus-Host*-Reaktionen auszulösen [199]. Zukünftig könnten gezielte Analysen solcher Kreuzreaktionsmuster helfen, potenziell therapeutisch nutzbare Reaktivitäten von gefährlichen *Off-Target*-Effekten abzugrenzen.

Für eine belastbare Sicherheitsbewertung ist ein mehrdimensionaler Validierungsansatz erforderlich. Hierzu zählen *in vitro* Modelle mit primären hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zielzellen ebenso wie bioinformatische Screenings potenzieller geteilter Epitope. Struktur- und sequenzbasierte Vergleichsanalysen erlauben es, Homologien zu physiologisch exprimierten Proteinen zu identifizieren und funktionell zu überprüfen. Ergänzend dazu könnten *in vivo* Modelle – wie etwa humanisierte Mausmodelle – gezielt in die präklinische Testung einbezogen werden, um systemische Effekte unter kontrollierten Bedingungen besser abschätzen zu können.

Auch die strukturbasierte Affinitätsmodulation kann zur Erhöhung der Sicherheit beitragen. Punktuelle Veränderungen, insbesondere in der CDR3-Region, könnten genutzt werden, um die Antigenspezifität zu schärfen und die Toleranz gegenüber nicht-zielgerichteten Strukturen zu erhöhen – ohne dabei die gewünschte Tumorreduktion zu gefährden.

Schließlich könnten immunmodulatorische Begleitstrategien, etwa durch gezielte Checkpoint-Blockade im Tumormilieu dazu beitragen, T-Zellen selektiv am Wirkort zu aktivieren und systemische Effekte zu minimieren. Insgesamt legen die vorliegenden Daten nahe, dass peptidspezifische TCRs funktionelle Reaktivität entfalten können, in Einzelfällen jedoch auch Reaktivitäten gegenüber nicht-malignen Zellen möglich sind. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterführender präklinischer Validierungen, um die Sicherheit künftiger TCR-basierter Therapien belastbar einschätzen zu können.

Ein zentraler Bestandteil der funktionellen Sicherheitsbewertung bestand zudem in der gezielten Blockade der Antigenpräsentation mittels monoklonaler Antikörper gegen HLA-Klasse-I- (Klon W6/32) bzw. HLA-Klasse-II-Moleküle (z. B. HLA-DR, Klon L243). Diese Blockade wurde in den Blasten-Challenge-Experimenten als funktionelle Negativkontrolle eingesetzt, um die HLA-abhängige, TCR-vermittelte Aktivierung zu überprüfen. Künftig könnte die gezielte Blockade der Antigenpräsentation – etwa mittels HLA-spezifischer monoklonaler Antikörper – in präklinischen Assays standardisiert eingesetzt werden, um die funktionelle HLA-Restriktion neu entwickelter TCRs zuverlässig nachzuweisen.

4.5.2 Affinitätsoptimierung und funktionelle Verstärkung peptidspezifischer TCRs

Neben der Antigenspezifität bestimmt insbesondere die Affinität eines T-Zell-Rezeptors maßgeblich dessen therapeutisches Potenzial. Eine zu geringe Bindungsstärke kann die Effektivität der Immunantwort limitieren, während eine überhöhte Affinität aber zugleich das Risiko unspezifischer Reaktivität und potenzieller Autoimmunität erhöhen kann. Ziel künftiger Entwicklungen muss daher eine fein austarierte Affinitätsmodulation sein, die die tumorgerichtete Reaktivität stärkt, ohne die Selektivität zu kompromittieren.

Punktmutationen an definierten Positionen könnten die Interaktionsfläche optimieren, die Bindungskinetik verbessern und damit die funktionelle Aktivierungsschwelle der T-Zelle absenken. Neben der Affinität kann auch die *dwell time*, also die Verweildauer der TCR-Peptid-MHC-Interaktion eine entscheidende Rolle spielen. Eine verlängerte *dwell time* könnte die intrazelluläre Signalweiterleitung verstärken, ohne zwangsläufig mit erhöhter *Off-Target*-Reaktivität einherzugehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit funktionell charakterisierten TCRs bieten eine geeignete Grundlage für solche Optimierungsstrategien – insbesondere im Hinblick auf ihre Antigenpezifität, MHC-Restriktion und differenzierte Aktivierungsmuster. In Fällen mit suboptimaler Funktionalität könnten gezielte Affinitätsmodifikationen genutzt werden, um die therapeutische Wirksamkeit gezielt zu steigern. Für hochspezifische, aber schwach reagierende TCRs könnte dies insbesondere im Kontext solider Tumoren mit immunsuppressivem Mikromilieu ein entscheidender Vorteil sein. Ergänzend lässt sich die Effektorleistung TCR-transgener T-Zellen durch die Integration kostimulatorischer Signalachsen weiter verstärken. Die Ko-Expression von Molekülen wie CD28 oder 4-1BB kann die Proliferation, Persistenz und Resistenz gegenüber inhibitorischen Faktoren wie PD-L1 verbessern. Insbesondere in *in vivo*-Settings mit chronischer Antigenexposition oder erschöpftem Immunstatus könnten solche Strategien zur Generierung langlebiger, funktionell stabiler Effektorzellen beitragen [207].

4.5.3 Technologische Innovationen als Wegbereiter zukünftiger TCR-Therapien

Die Weiterentwicklung TCR-basierter Therapien wird in entscheidendem Maße durch technologische Innovationen vorangetrieben. Maschinelle Lernmodelle könnten künftig dabei helfen, immunogene Peptide präziser zu identifizieren und TCR-Interaktionen genauer zu modellieren. Solche Algorithmen könnten auch zur gezielten Affinitätsmodulation beitragen, indem sie strukturelle Merkmale identifizieren, die mit hoher Bindungsspezifität und funktioneller Aktivität korrelieren.

Parallel dazu ermöglichen moderne Zellkulturtechnologien wie Tumorganoide oder mikrofluidikbasierte Ko-Kultursysteme eine physiologisch realitätsnahe Testung von TCR-Funktionalität und Sicherheit *in vitro*. Diese Plattformen bieten die Möglichkeit, patientenspezifische Tumormikromilieus nachzubilden und individuelle Immunantworten besser zu modellieren.

Die präzise Genomeditionierung durch CRISPR-Cas9 – etwa im Rahmen orthotoper TCR-Integration – eröffnet neue Möglichkeiten für standardisierte, funktionsstabile Zellprodukte. Perspektivisch könnten zusätzliche Modifikationen, etwa durch Integration synthetischer Signalverstärker, die Effektivität solcher T-Zellen weiter steigern.

Insgesamt bilden diese technologischen Fortschritte die Grundlage für eine neue Generation TCR-basierter Therapien, die durch gesteigerte Sicherheit, funktionelle Präzision und breitere Anwendbarkeit überzeugen könnten und das Spektrum personalisierter Immuntherapien substantiell erweitern dürften.

4.6 Schlussfolgerung

Ausgehend von der funktionellen Analyse neoantigenspezifischer T-Zellrezeptoren beleuchtet diese Arbeit deren potenzielle Eignung für personalisierte immuntherapeutische Anwendungen. Auf Basis von Einzelzellanalysen nach Peptidvakzinierung konnten mehrere dieser TCRs identifiziert, funktionell charakterisiert und hinsichtlich ihrer Spezifität sowie Sicherheit überprüft werden.

Ein zentraler methodischer Baustein war der Einsatz des orthotopen TCR-Replacement-Systems, das eine standardisierte und präzise Analyse der TCR-vermittelten Signalübertragung in einem reporterbasierten Modell ermöglichte. Dieses System erwies sich als leistungsfähiges Instrument zur vergleichenden Charakterisierung neoantigenspezifischer TCRs und bildete die Grundlage für deren funktionelle Validierung. Die Analysen identifizierten sowohl hochspezifische Rezeptoren als auch einzelne TCRs mit unerwarteter Reaktivität gegenüber unbeladenen B-Zell-Blasten – ein Befund, der die Notwendigkeit umfassender präklinischer Sicherheitsprüfungen vor einem möglichen klinischen Einsatz deutlich macht.

Die gewonnenen Daten belegen das Potenzial einer kombinierten Strategie aus Peptidvakzinierung und adoptivem TCR-T-Zelltransfer zur gezielten Aktivierung tumorspezifischer Immunantworten. Die beobachtete Persistenz impfinduzierter T-Zellen weist auf die Möglichkeit einer langfristigen immunologischen Kontrolle hin, die insbesondere bei malignen Erkrankungen mit hohem Rezidivrisiko klinisch bedeutsam sein könnte. Gleichzeitig wird die bestehende Herausforderung der begrenzten Vorhersagbarkeit immunogener MHC-Klasse-II-Peptide deutlich.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten funktionellen Validierungsdaten könnten als Ausgangspunkt zur Verfeinerung bioinformatischer Peptidvorhersagealgorithmen dienen. Um deren Aussagekraft und klinische Anwendbarkeit zu stärken, sind jedoch weiterführende Analysen einer größeren Anzahl impfstoffinduzierter beziehungsweise neoantigenspezifischer T-Zellen erforderlich. Nur durch systematische Validierung einer größeren Zahl solcher TCRs lässt sich deren therapeutisches Potenzial langfristig besser abschätzen. Darüber hinaus bleibt die umfassende Sicherheitsbewertung identifizierter TCRs – einschließlich potenzieller *Off-Target*-Reaktivitäten – eine zentrale Voraussetzung für die klinische Weiterentwicklung.

Die dynamische Entwicklung in den Bereichen Sequenzierungstechnologie, Genomeditierung und künstliche Intelligenz eröffnet neue Perspektiven für die Optimierung TCR-basierter Immuntherapien. Insbesondere die Kombination aus strukturbasiertem TCR-Design, verbesserter Peptidvorhersage und innovativen zellulären Testsystemen birgt das Potenzial, Sicherheit, Wirksamkeit und klinische Anwendbarkeit künftiger TCR-Therapien entscheidend zu verbessern.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass neoantigenspezifische TCRs nicht nur prinzipiell identifizierbar und funktionell validierbar sind, sondern auch ein hohes translationales Potenzial besitzen. Die Verbindung aus präziser Antigenidentifikation, funktioneller TCR-Analyse und methodischer Weiterentwicklung bildet somit eine belastbare Grundlage für die zukünftige Entwicklung sicherer, wirksamer und personalisierter TCR-Therapien in der klinischen Onkologie.

5 Literaturverzeichnis

1. Moosmann, C., et al., *Orthotopic T-cell receptor replacement in primary human T cells using CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair*. STAR Protoc, 2022. **3**(1): p. 101031.
2. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie*. 2018.
3. Purcell, A.W., J. McCluskey, and J. Rossjohn, *More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 404-14.
4. Groettrup, M., C.J. Kirk, and M. Basler, *Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 73-8.
5. Dong, C., *Cytokine Regulation and Function in T Cells*. Annu Rev Immunol, 2021. **39**: p. 51-76.
6. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2024. **74**(3): p. 229-263.
7. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
8. Riley, R.S., et al., *Delivery technologies for cancer immunotherapy*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(3): p. 175-196.
9. Barrett, D.M., et al., *Chimeric antigen receptor therapy for cancer*. Annu Rev Med, 2014. **65**: p. 333-47.
10. Manfredi, F., et al., *TCR Redirected T Cells for Cancer Treatment: Achievements, Hurdles, and Goals*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1689.
11. Ti, D., et al., *Adaptive T cell immunotherapy in cancer*. Sci China Life Sci, 2021. **64**(3): p. 363-371.
12. Yadav, M., et al., *Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 572-6.
13. Gubin, M.M., et al., *Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 577-81.
14. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. Tenth edition. / Kenneth Murphy, Casey Weaver, Leslie J. Berg. ed. Immunobiology. 2022, New York: W.W. Norton and Company.
15. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
16. Keir, M.E., et al., *Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 883-95.
17. Sahin, U. and Ö. Türeci, *Personalized vaccines for cancer immunotherapy*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1355-1360.
18. Ott, P.A., et al., *An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 217-221.
19. Bassani-Sternberg, M., et al., *Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13404.
20. Sahin, U., et al., *Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 222-226.
21. Keskin, D.B., et al., *Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial*. Nature, 2019. **565**(7738): p. 234-239.
22. Englisch, A., et al., *iVAC-XS15-CLL01: personalized multi-peptide vaccination in combination with the TLR1/2 ligand XS15 in CLL patients undergoing BTK-inhibitor-based regimens*. Front Oncol, 2024. **14**: p. 1441625.

23. Schober, K., et al., *Orthotopic replacement of T-cell receptor α - and β -chains with preservation of near-physiological T-cell function*. Nat Biomed Eng, 2019. **3**(12): p. 974-984.
24. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
25. McDade, T.W. and C.M. Worthman, *Evolutionary process and the ecology of human immune function*. Am J Hum Biol, 1999. **11**(6): p. 705-717.
26. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin, *Autoimmune disease: why and where it occurs*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 899-905.
27. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
28. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
29. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
30. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
31. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
32. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
33. Chi, H., M. Pepper, and P.G. Thomas, *Principles and therapeutic applications of adaptive immunity*. Cell, 2024. **187**(9): p. 2052-2078.
34. Hoffmann, J.A. and J.M. Reichhart, *Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 121-6.
35. Cooper, M.D. and M.N. Alder, *The evolution of adaptive immune systems*. Cell, 2006. **124**(4): p. 815-22.
36. Flajnik, M.F. and M. Kasahara, *Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 47-59.
37. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
38. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
39. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
40. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5707-13.
41. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
42. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(2): p. 75-85.
43. Selsted, M.E., et al., *Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16430.
44. Huber, H., et al., *Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G*. Science, 1968. **162**(3859): p. 1281-3.
45. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
46. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
47. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
48. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.

49. Broz, P. and V.M. Dixit, *Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(7): p. 407-20.
50. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
51. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
52. Ljunggren, H.-G. and K. Kärre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunology Today, 1990. **11**: p. 237-244.
53. Lanier, L.L., *Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I*. Cell, 1998. **92**(6): p. 705-7.
54. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 126-34.
55. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(8): p. 557-569.
56. Gabrilovich, D., et al., *Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4150-66.
57. Noy, R. and Jeffrey W. Pollard, *Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 49-61.
58. Adams, S., *Toll-like receptor agonists in cancer therapy*. Immunotherapy, 2009. **1**(6): p. 949-64.
59. Corrales, L. and T.F. Gajewski, *Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(21): p. 4774-9.
60. Cassetta, L. and J.W. Pollard, *Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(12): p. 887-904.
61. Koch, U. and F. Radtke, *Mechanisms of T cell development and transformation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 539-62.
62. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
63. Komori, T., et al., *Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes*. Science, 1993. **261**(5125): p. 1171-5.
64. Schatz, D.G. and P.C. Swanson, *V(D)J recombination: mechanisms of initiation*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 167-202.
65. Scott, B., et al., *The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens*. Nature, 1989. **338**(6216): p. 591-3.
66. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
67. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. Nature Immunology, 2003. **4**(4): p. 350-354.
68. Palmer, E., *Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 383-91.
69. Weinreich, M.A. and K.A. Hogquist, *Thymic emigration: when and how T cells leave home*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2265-70.
70. Egerton, M., R. Scollay, and K. Shortman, *Kinetics of mature T-cell development in the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2579-82.
71. Gotch, F., et al., *Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2*. Nature, 1987. **326**(6116): p. 881-2.
72. Dong, D., et al., *Author Correction: Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex*. Nature, 2021. **590**(7846): p. E52.
73. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
74. Shahinian, A., et al., *Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice*. Science, 1993. **261**(5121): p. 609-12.

75. Schwartz, R.H., *T Cell Anergy**. Annual Review of Immunology, 2003. **21**(Volume 21, 2003): p. 305-334.
76. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
77. Gudmundsdottir, H., A.D. Wells, and L.A. Turka, *Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5212-23.
78. Adams, N.M., S. Grassmann, and J.C. Sun, *Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(11): p. 694-707.
79. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
80. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *Two types of mouse helper T-cell clone Implications for immune regulation*. Immunol Today, 1987. **8**(7-8): p. 223-7.
81. Stout, R.D. and K. Bottomly, *Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages*. J Immunol, 1989. **142**(3): p. 760-5.
82. Croft, M. and S.L. Swain, *B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6*. J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4055-64.
83. de Vries, J.E., et al., *Antagonizing the differentiation and functions of human T helper type 2 cells*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(6): p. 771-8.
84. Romagnani, S., *Lymphokine production by human T cells in disease states*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 227-57.
85. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
86. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
87. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
88. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
89. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
90. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
91. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular Helper T Cells*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 335-68.
92. Jensen, P.E., *Mechanisms of antigen presentation*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(3): p. 179-86.
93. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
94. Podack, E.R. and P.J. Konigsberg, *Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization*. J Exp Med, 1984. **160**(3): p. 695-710.
95. Heusel, J.W., et al., *Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells*. Cell, 1994. **76**(6): p. 977-87.
96. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
97. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.

98. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. *Science*, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
99. Bach, F.H., M.L. Bach, and P.M. Sondel, *Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation*. *Nature*, 1976. **259**(5541): p. 273-81.
100. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Major transplantation antigens, viruses, and specificity of surveillance T cells*. *Contemp Top Immunobiol*, 1977. **7**: p. 179-220.
101. Van Laethem, F., A.N. Tikhonova, and A. Singer, *MHC restriction is imposed on a diverse T cell receptor repertoire by CD4 and CD8 co-receptors during thymic selection*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(9): p. 437-41.
102. Rock, K.L. and A.L. Goldberg, *Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 739-79.
103. Beninga, J., K.L. Rock, and A.L. Goldberg, *Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18734-42.
104. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(12): p. 823-36.
105. Neefjes, J.J., F. Momburg, and G.J. Hammerling, *Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter*. *Science*, 1993. **261**(5122): p. 769-71.
106. Wearsch, P.A. and P. Cresswell, *The quality control of MHC class I peptide loading*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(6): p. 624-31.
107. Benham, A.M. and J.J. Neefjes, *Antigen processing by the class I pathway*. *Biochem Soc Trans*, 1995. **23**(3): p. 664-9.
108. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(8): p. 607-18.
109. Reith, W., S. LeibundGut-Landmann, and J.M. Waldburger, *Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(10): p. 793-806.
110. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
111. Denzin, L.K. and P. Cresswell, *HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading*. *Cell*, 1995. **82**(1): p. 155-65.
112. Hiltbold, E.M. and P.A. Roche, *Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 30-5.
113. Lennon-Duménil, A.M., et al., *A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 15-21.
114. Berger, A.C. and P.A. Roche, *MHC class II transport at a glance*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 1): p. 1-4.
115. Robinson, J., et al., *IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex*. *Tissue Antigens*, 2000. **55**(3): p. 280-7.
116. Sidney, J., et al., *HLA class I supertypes: a revised and updated classification*. *BMC Immunology*, 2008. **9**(1): p. 1.
117. Yewdell, J.W. and J.R. Bennink, *IMMUNODOMINANCE IN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I-RESTRICTED T LYMPHOCYTE RESPONSES1*. *Annual Review of Immunology*, 1999. **17**(Volume 17, 1999): p. 51-88.
118. Robinson, J., et al., *The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D423-31.
119. Erlich, H., et al., *HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk: Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 1084-1092.

120. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 1987. **30**(11): p. 1205-1213.
121. Khan, M.A., *Update on spondyloarthropathies*. Ann Intern Med, 2002. **136**(12): p. 896-907.
122. Prugnotte, F., et al., *Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity*. Curr Biol, 2005. **15**(11): p. 1022-7.
123. Gutiérrez-Martínez, E., et al., *Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 363.
124. Kurts, C., B.W. Robinson, and P.A. Knolle, *Cross-priming in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 403-14.
125. Nopora, K., et al., *MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 348.
126. Dhatchinamoorthy, K., J.D. Colbert, and K.L. Rock, *Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 636568.
127. Natali, P.G., et al., *Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6719-23.
128. Taylor, B.C. and J.M. Balko, *Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 844866.
129. Draghi, M., et al., *Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2028-35.
130. Tada, T., et al., *Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state*. J Immunol, 1991. **146**(3): p. 1077-82.
131. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
132. Beatty, G.L. and W.L. Gladney, *Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 687-92.
133. Kärre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. 1986. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6566-9.
134. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
135. Mackaness, G.B., *The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo*. J Exp Med, 1969. **129**(5): p. 973-92.
136. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
137. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
138. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
139. Ferretti, G., et al., *Does CTLA4 influence the suppressive effect of CD25+CD4+ regulatory T cells?* J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5469-70; author reply 5470-1.
140. Burr, M.L., et al., *CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity*. Nature, 2017. **549**(7670): p. 101-105.
141. Jäger, E., et al., *Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 142-7.

142. Paul, P., et al., *HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4510-5.
143. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: from biology to clinical benefits*. Trends Immunol, 2008. **29**(3): p. 125-32.
144. Jarnicki, A.G., et al., *Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 896-904.
145. Kumar, V., et al., *The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment*. Trends in Immunology, 2016. **37**(3): p. 208-220.
146. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(19): p. 12293-12297.
147. Sansom, D.M., *CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?* Immunology, 2000. **101**(2): p. 169-77.
148. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
149. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(2): p. 122-133.
150. Munn, D.H. and A.L. Mellor, *Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1147-54.
151. Prendergast, G.C., *Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3889-900.
152. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
153. Restifo, N.P., et al., *Identification of human cancers deficient in antigen processing*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 265-72.
154. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 122-33.
155. Wei, S.C., et al., *Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade*. Cell, 2017. **170**(6): p. 1120-1133.e17.
156. Rohaan, M.W., S. Wilgenhof, and J. Haanen, *Adoptive cellular therapies: the current landscape*. Virchows Arch, 2019. **474**(4): p. 449-461.
157. Gill, S. and C.H. June, *Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies*. Immunol Rev, 2015. **263**(1): p. 68-89.
158. Coccoris, M., et al., *Long-term functionality of TCR-transduced T cells in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6536-43.
159. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
160. Wirth, T.C. and F. Kühnel, *Neoantigen Targeting-Dawn of a New Era in Cancer Immunotherapy?* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1848.
161. Matsushita, H., et al., *Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 400-4.
162. Tokita, S., T. Kanaseki, and T. Torigoe, *Neoantigen prioritization based on antigen processing and presentation*. Frontiers in Immunology, 2024. **15**.
163. Turajlic, S., et al., *Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis*. The Lancet Oncology, 2017. **18**(8): p. 1009-1021.
164. Yang, W., et al., *Immunogenic neoantigens derived from gene fusions stimulate T cell responses*. Nat Med, 2019. **25**(5): p. 767-775.
165. Sng, C.C.T., et al., *Untranslated regions (UTRs) are a potential novel source of neoantigens for personalised immunotherapy*. Frontiers in Immunology, 2024. **15**.
166. Zhu, Y. and J. Liu, *The Role of Neoantigens in Cancer Immunotherapy*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 682325.
167. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 1991. **351**(6324): p. 290-6.

168. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
169. Jensen, K.K., et al., *Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules*. Immunology, 2018. **154**(3): p. 394-406.
170. Weinzierl, A.O., et al., *Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 102-13.
171. Tran, E., et al., *T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(23): p. 2255-2262.
172. Ishihara, M., et al., *A phase 1 trial of NY-ESO-1-specific TCR-engineered T-cell therapy combined with a lymph node-targeting nanoparticulate peptide vaccine for the treatment of advanced soft tissue sarcoma*. Int J Cancer, 2023. **152**(12): p. 2554-2566.
173. Rafiq, S., C.S. Hackett, and R.J. Brentjens, *Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(3): p. 147-167.
174. Jung, S., et al., *AML-VAC-XS15-01: protocol of a first-in-human clinical trial to evaluate the safety, tolerability and preliminary efficacy of a multi-peptide vaccine based on leukemia stem cell antigens in acute myeloid leukemia patients*. Front Oncol, 2024. **14**: p. 1458449.
175. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-892.
176. McGranahan, N. and C. Swanton, *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future*. Cell, 2017. **168**(4): p. 613-628.
177. Ren, Y., et al., *HLA class-I and class-II restricted neoantigen loads predict overall survival in breast cancer*. Oncoimmunology, 2020. **9**(1): p. 1744947.
178. Han, J., et al., *Assessment of human leukocyte antigen-based neoantigen presentation to determine pan-cancer response to immunotherapy*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 1199.
179. Sharma, P., et al., *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Cell, 2017. **168**(4): p. 707-723.
180. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
181. Prior, I.A., F.E. Hood, and J.L. Hartley, *The Frequency of Ras Mutations in Cancer*. Cancer Res, 2020. **80**(14): p. 2969-2974.
182. Xie, N., et al., *Neoantigens: promising targets for cancer therapy*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 9.
183. Hu, Z., et al., *Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma*. Nat Med, 2021. **27**(3): p. 515-525.
184. Hoerr, I., *RNA-Vakzine zur Induktion von spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und Antikörpern*. 1999, Universität Tübingen.
185. Hoerr, I., et al., *In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies*. European Journal of Immunology, 2000. **30**(1): p. 1-7.
186. Rammensee, H.G., et al., *[Tumor vaccines-therapeutic vaccination against cancer]*. Internist (Berl), 2020. **61**(7): p. 690-698.
187. Huff, A.L., et al., *CD4 T cell-activating neoantigens enhance personalized cancer vaccine efficacy*. JCI Insight, 2023. **8**(23).
188. Roskopf, S., et al., *A Jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate TCR functions and adoptive T cell strategies*. Oncotarget, 2018. **9**(25): p. 17608-17619.
189. Müller, T.R., et al., *A T-cell reporter platform for high-throughput and reliable investigation of TCR function and biology*. Clin Transl Immunology, 2020. **9**(11): p. e1216.
190. Müller, T.R., et al., *Targeted T cell receptor gene editing provides predictable T cell product function for immunotherapy*. Cell Rep Med, 2021. **2**(8): p. 100374.

191. Blass, E. and P.A. Ott, *Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021. **18**(4): p. 215-229.
192. Gouttefangeas, C., R. Klein, and A. Maia, *The good and the bad of T cell cross-reactivity: challenges and opportunities for novel therapeutics in autoimmunity and cancer*. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1212546.
193. Dolina, J.S., et al., *Linked CD4+/CD8+ T cell neoantigen vaccination overcomes immune checkpoint blockade resistance and enables tumor regression*. *J Clin Invest*, 2023. **133**(17).
194. Locatelli, F., et al., *Effect of Blinatumomab vs Chemotherapy on Event-Free Survival Among Children With High-risk First-Relapse B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2021. **325**(9): p. 843-854.
195. Brown, P.A., et al., *Effect of Postreinduction Therapy Consolidation With Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults With First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2021. **325**(9): p. 833-842.
196. Spiegel, J.Y., et al., *CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial*. *Nature Medicine*, 2021. **27**(8): p. 1419-1431.
197. O'Brien, M.M., et al., *Phase II Trial of Inotuzumab Ozogamicin in Children and Adolescents With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Children's Oncology Group Protocol AALL1621*. *J Clin Oncol*, 2022. **40**(9): p. 956-967.
198. Pan, J., et al., *Donor-Derived CD7 Chimeric Antigen Receptor T Cells for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: First-in-Human, Phase I Trial*. *J Clin Oncol*, 2021. **39**(30): p. 3340-3351.
199. Rettinger, E., et al., *Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation*. *Blood*, 2011. **118**(20): p. 5681-8.
200. Chlewicki, L.K., et al., *High-affinity, peptide-specific T cell receptors can be generated by mutations in CDR1, CDR2 or CDR3*. *J Mol Biol*, 2005. **346**(1): p. 223-39.
201. Cha, E., et al., *IL-7 + IL-15 are superior to IL-2 for the ex vivo expansion of 4T1 mammary carcinoma-specific T cells with greater efficacy against tumors in vivo*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **122**(2): p. 359-69.
202. Heather, J.M., et al., *High-throughput sequencing of the T-cell receptor repertoire: pitfalls and opportunities*. *Brief Bioinform*, 2018. **19**(4): p. 554-565.
203. Alsalloum, A., J.A. Shevchenko, and S. Sennikov, *NY-ESO-1 antigen: A promising frontier in cancer immunotherapy*. *Clin Transl Med*, 2024. **14**(9): p. e70020.
204. Hong, D.S., et al., *Autologous T cell therapy for MAGE-A4(+) solid cancers in HLA-A*02(+) patients: a phase 1 trial*. *Nat Med*, 2023. **29**(1): p. 104-114.
205. Zanotta, S., et al., *Enhancing Dendritic Cell Cancer Vaccination: The Synergy of Immune Checkpoint Inhibitors in Combined Therapies*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. **25**(14): p. 7509.
206. Klebanoff, C.A., et al., *T cell receptor therapeutics: immunological targeting of the intracellular cancer proteome*. *Nat Rev Drug Discov*, 2023. **22**(12): p. 996-1017.
207. Kawalekar, O.U., et al., *Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells*. *Immunity*, 2016. **44**(2): p. 380-390.

6 Anhang

6.1 Publikationen

6.1.1 Originalpublikationen

Maier CP, Klose C, Seitz CM, Heubach F, Döring M, Meisel R, Schuster F, Gruhn B, Keller F, Rabsteyn A, Arendt AM, **Amorelli G**, Eichholz T, Feuchtinger T, Martinius H, Nierkens S, Teltschik R, Schulte JH, Lengerke C, Handgretinger R, Lang P. **Influence of ATLG serum levels on CD3/CD19-depleted hematopoietic grafts and on immune recovery in pediatric haplo-HSCT.** Blood Adv 8, 2160-2171 (2024).

Flaad T, Jaki C, Maier CP, **Amorelli G**, Klingebiel T, Schlegel PG, Exrich M, Greil J, Schulte JH, Bader P, Handgretinger R, Lang P. **Immune reconstitution after transplantation of autologous peripheral stem cells in children: a comparison between CD34+ selected and nonmanipulated grafts.** Cytotherapy (2024).

Arendt AM, Heubach F, Maier CP, Giardino S, Jung G, Kowalewski E, Rabsteyn A, **Amorelli G**, Seitz C, Schlegel P, Handgretinger R, Lang P. **Targeting GD2 after allogeneic SCT: effector cell composition defines the optimal use of ch14.18 and the bispecific antibody construct NG-CU (GD2-CD3).** Cancer Immunol Immunother 72, 3813-3824 (2023).

6.1.2 Konferenzen

CIMT 2022, Mainz: IVAC-AN: Analysis of neoantigen distribution, presentation and recognition by patient-individualised vaccine-induced specific T cells in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia (Poster)

Image-guided and Functionally Instructed Tumor therapies (iFIT) Conference 2023, Zell am See (Österreich): IVAC-AN: Analysis of neoantigen distribution, presentation and recognition by patient-individualized vaccine-induced specific T cells in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia (ALL) (Poster)

EBMT 2024, Glasgow (UK)

6.2 Sequenzinformationen und struktureller Aufbau des TCR-Konstrukts

6.2.1 Vollständige TCR Sequenzen

Die zur orthotopen Integration verwendeten Sequenzen der transgenen TCR- α - und - β -Ketten sind im Folgenden im FASTA-Format dargestellt. Sie umfassen die vollständige VDJ-Rekombination einschließlich TRAV-, TRAJ-, TRBV- und TRBJ-Regionen sowie die jeweilige CDR3-Sequenz.

>TRAC_TCR_KI_Alpha

```
ATATCCAGAACCCAGAACCTGCTGTGTACCAGTTAAAAGATCCTCGGTCTCA
GGACAGCACCCCTCTGCCTGTTACCGACTTTGACTCCCAAATCAATGTGCCG
AAAACCATGGAATCTGGAACGTTCACTGACAAATGCGTGCTGGACATGA
AAGCTATGGATTCCAAGAGCAATGGGGCCATTGCCTGGAGCAACCAGACAAG
CTTCACCTGCCAAGATATCTTCAAAGAGACCAACGCCACCTACCCCAGTTCA
GACGTTCCCTGTGATGCCACGTTGACTGAGAAAAGCTTTGAAACAGATATGA
ACCTAAACTTTCAAACCTGTCAGTTATGGGACTCCGAATCCTCCTGCTGAAA
GTAGCCGGATTTAACCTGCTCATGACGCTGAGGCTGTGGTCCAGTTGA
```

>TRAC_TCR_KI_Beta

```
AGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAGGTCTCCTTGTTTGAGCCATCAAAA
GCAGAGATTGCAAACAAACAAAAGGCTACCCTCGTGTGCTTGGCCAGGGGCT
TCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAGGAGGTCC
ACAGTGGGGTCTGCACGGACCCTCAGGCCTACAAGGAGAGCAATTATAGCTA
CTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCTGCTACCTTCTGGCACAATCCTCGA
AACCATTCCGCTGCCAAGTGCAAGTTCCATGGGCTTTCAGAGGAGGACAAGT
GGCCAGAGGGGCTCACCCAAACCTGTCACACAGAACATCAGTGCAGAGGCCT
GGGGCCGAGCAGACTGTGGAATCACTTCAGCATCCTATCATCAGGGGGTTCT
GTCTGCAACCATCCTCTATGAGATCCTACTGGGGAAGGCCACCCTATATGCT
GTGCTGGTCAGTGGCCTGGTGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAAAAAAATTCC
```

6.2.2 Strukturelle Organisation des HDR-Templates

Das für die CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration verwendete Template basiert auf einem modularen Aufbau, der aus konstanten funktionellen Elementen und variablen, patientenspezifischen Sequenzanteilen besteht. Die konstanten Bestandteile gewährleisten eine effiziente Expression, Stabilität und gezielte

genomische Integration des Konstrukts. Die CDR3-Regionen wurden individuell eingefügt und sind im Haupttext (Kapitel 2.4.7.2, Tabelle 6) aufgeführt.

Nachfolgende Übersicht beschreibt den Aufbau des Templates und klassifiziert die einzelnen Komponenten als konstant oder variabel:

Tabelle 36 Struktureller Aufbau des HDR-Templates für die CRISPR-Cas9-vermittelte TCR-Integration.

Template-Element	Beschreibung	Typ
5'-Homologiearm (LHA)	~300 bp upstream des TRAC-Lokus zur gezielten Integration durch homologiesteuerte Rekombination	konstant
P2A-Linker	Selbstspaltendes Peptid zur Trennung der β - und α -Kette (polyzytronische Expression)	konstant
TCR-β-Kette	TRBV-, TRBD- und TRBJ-Segmente, CDR3; murine TRBC-Konstante mit Cystein-Modifikation	<i>variabel</i>
T2A-Linker	Selbstspaltendes Peptid zur Trennung der α -Kette vom nachfolgenden Element	konstant
TCR-α-Kette	TRAV- und TRAJ-Segmente, CDR3; murine TRAC-Konstante mit Cystein-Modifikation	<i>variabel</i>
PolyA (bGHpA)	Polyadenylierungssignal zur Stabilisierung der mRNA	konstant
3'-Homologiearm (RHA)	~300 bp downstream des TRAC-Lokus zur Sicherstellung der Integration	konstant

Zur eindeutigen Detektion erfolgreich edierter Zellen wurden die konstanten Domänen der α - und β -Kette jeweils mit einer murinen TRAC- beziehungsweise TRBC-Konstante ausgestattet. Diese ermöglichen den spezifischen Nachweis durch antikörperbasierte Durchflusszytometrie.

Abbildung 28 veranschaulicht den schematischen Aufbau des für die OTR verwendeten HDR-Templates.

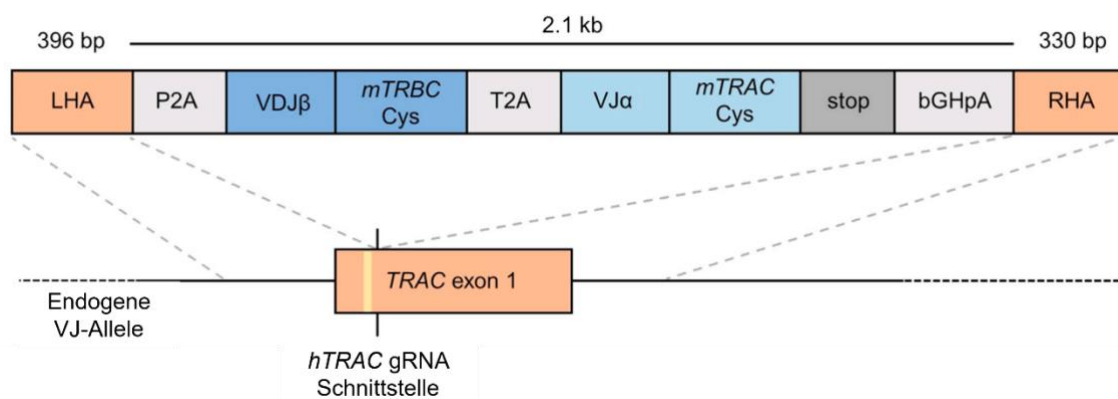


Abbildung 28 Schematischer Aufbau des DNA-Templates zur Integration der TCR- α - und - β -Kette in den humanen TRAC-Lokus mittels homologiegesteuerter Rekombination (HDR).

LHA: linker Homologiearm; RHA: rechter Homologiearm; VDJ β : variable Domäne der β -Kette; mTRBC-Cys: murine konstante TCR- β -Domäne mit zusätzlicher Disulfidbrücke; VJ α : variable Domäne der α -Kette; mTRAC-Cys: murine konstante TCR- α -Domäne mit zusätzlicher Disulfidbrücke; bGHpA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; T2A/P2A: selbstspaltende Peptidsequenzen zur polyzistronischen Expression. Das TRAC-Exon 1 ist orange markiert, die PAM-Sequenz ist gelb hervorgehoben. Modifiziert nach [1]

6.2.3 Vektor- und Plasmidinformation

Das vollständige Template wurde synthetisch generiert (Twist Bioscience, San Francisco, USA) und in den Hoch-Kopie-Vektor pTwist-AMP kloniert, um eine effiziente Bereitstellung für die anschließende CRISPR-Cas9-Integration per Elektroporation zu gewährleisten. Der Vektor basiert auf einem pMB1-Replikationsursprung und enthält folgende funktionelle Elemente:

- Ampicillinresistenzkassette zur bakteriellen Selektion in *E. coli*
- Twist-eigene Primerbindungsstellen zur gezielten PCR-Amplifikation des Inserts
- M13-Forward- und -Reverse-Primerstellen zur vereinfachten Insert-Sequenzierung

Das Plasmid diente ausschließlich als Trägermolekül zur Vervielfältigung und Bereitstellung des Templates für die OTR-Experimente.

6.3 Danksagung

Amor vincit omnia — Vergil, Eclogae X, 69

Mein herzlicher Dank gilt

... Prof. Dr. Peter Lang, für die Aufnahme in die Kinderklinik und die Möglichkeit, dieses spannende Forschungsthema bearbeiten zu dürfen, sowie für die Betreuung meiner Arbeit.

... Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, für die wissenschaftliche Begleitung und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

... Prof. Dr. Jürgen Frank, für die Aufnahme in das vom DKFZ (DKTK) geförderte Projekt IVAC-AN sowie für die organisatorische Unterstützung.

... Prof. Dr. Dirk Busch (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München) und

... Prof. Dr. Leo Hansmann (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) für die wissenschaftliche Kooperation im Rahmen des IVAC-AN-Projekts

... Dr. Elvira D'Ippolito und Sabrina Wagner, für den intensiven fachlichen Austausch und die bereichernde Zusammenarbeit.

... Prof. Dr. Arend von Stackelberg (Charité – Universitätsmedizin Berlin), für die Bereitstellung von Patientenmaterial sowie Hintergrundinformationen.

... Roksana, Philipp, Finn, Flo, Armin und Anne, für die stets angenehme und produktive Zeit im Labor – und darüber hinaus.

...Chrisi, Eva, Johanna und insbesondere Lea und Janet – für ihre Geduld, ihr kritisches Auge und ihre große Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Und zuletzt – von Herzen –

meiner Familie: für alles.

7 Erklärung

Ich versichere, dass ich die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Von anderen Personen übernommene Daten oder durchgeführte Arbeiten sind als solche gekennzeichnet.

Tübingen, den 26.06.2025